

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I -
Campus Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg

**VERWENDUNG DES TBX5-PROMOTORS ZUR
MAGNET-ANTIKÖRPER BASIERTEN
ZELLAUFREINIGUNG (MACS) KARDIALER
VORLÄUFERZELLEN AUS EMBRYONALEN
STAMMZELLEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
CAROLIN CHRISTINA ANNE FELDMANN

aus Freiburg im Breisgau

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Bernhard F. Becker PD Dr. med. Christoph Walz
Betreuung durch den Mitarbeiter:	Prof. Dr. rer. nat. Robert David
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	05.12.2013

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
1.1 Klinischer Hintergrund	1
1.1.1 Ischämische Herzerkrankungen und ihre weltweite Bedeutung	1
1.2 Stammzelltherapeutische Ansätze als zukünftige Alternativen zur Herztransplantation.....	3
1.3 Adulte und embryonale Stammzellen	5
1.3.1 Definition von Stammzellen	5
1.3.2 Progenitorzellen und ihre Limitation hinsichtlich kardialer Zelltherapie	6
1.3.2.1 Skelettmuskelspezifische Progenitorzellen	7
1.3.2.2 Progenitorzellen aus dem Knochenmark.....	7
1.3.3 Embryonale Stammzellen	8
1.3.3.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen.....	9
1.3.4 Pluripotente Stammzeleigenschaften und alternative Generierung pluripotenter Stammzellen.....	10
1.3.4.1 Kardiale Differenzierung von Stammzellen	12
1.4 Embryonalentwicklung des Herzens	14
1.5 Der kardiale Transkriptionsfaktor Tbx5.....	17
1.5.1 Tbx5 als Mitglied der T-Box-Genfamilie	17
1.5.2 Charakterisierung von Tbx5-Gen und Protein.....	18
1.5.3 Expressionsmuster von Tbx5.....	19
1.5.4 Bedeutung von Tbx5 in der Kardiogenese	20
1.5.5 Mutationen von Tbx5	22
1.5.6 Zielgene von Tbx5 und seine Rolle innerhalb der T-Box-Familie	22
1.6 Wege zur klinischen Anwendung von embryonalen Stammzellen	25
1.6.1 Immunologische Problematik embryonaler Stammzellen und Alternativen	26
1.6.2 Zellüberleben und benötigte Zellmengen	29
1.6.3 Teratombildung durch embryonale Stammzellen.....	29
1.6.4 Elektromechanische Integration von ES-Zellen und die Gefahr von Arrhythmien.....	30
1.7 Herstellung reiner Kardiomyozytenpopulationen zur Transplantation.....	32
1.7.1 Initiale Anreicherung der Kardiomyozytenpopulation	32
1.7.2 Aufreinigung kardialer Vorläuferzellen.....	33
1.8 Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	37

II. MATERIAL UND METHODEN	39
2.1 Material.....	39
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	39
2.1.2 Enzyme und Proteine	40
2.1.3 Antikörper.....	40
2.1.3.1 Erstantikörper	40
2.1.3.2 Zweitantikörper	40
2.1.3.3 Isotypkontrollen.....	41
2.1.4 Sonstige Reagenzien für Immunfärbungen.....	41
2.1.5 Zellkultur	41
2.1.5.1 Zellen.....	41
2.1.5.2 Zellkultur-Materialien	41
2.1.6 Bakterienkultur	42
2.1.6.1 Bakterien	42
2.1.6.2 Bakterienkultur-Materialien	42
2.1.7 Laborgeräte und sonstige Materialien	42
2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen	44
2.1.8.1 ES-Zellkultur und -analyse.....	44
2.1.8.2 Bakterienkultur und Plasmidpräparation	45
2.1.8.3 Proteinbiochemische Methoden	46
2.1.9 Plasmide.....	47
2.1.10 Oligonukleotide	47
2.2 Methoden	49
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	49
2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien	49
2.2.1.2 Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode.....	49
2.2.2 DNA-Methoden	49
2.2.2.1 DNA-Präparation und -Aufreinigung	49
2.2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	49
2.2.2.1.1.1 TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA	50
2.2.2.1.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA	50
2.2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion	50
2.2.2.1.3 Ethanol-fällung	51
2.2.2.1.4 Isopropanolfällung	51
2.2.2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	51
2.2.2.2.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA	51
2.2.2.2.2 Dephosphorylierung der Vektor-DNA.....	52
2.2.2.2.3 Ligation	52
2.2.2.2.4 Analytische Gelelektrophorese.....	52
2.2.2.2.5 Präparative Gelelektrophorese	53
2.2.2.2.6 Sequenzierung der Plasmide	53
2.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	53
2.2.2.3.1 PCR zur Gewinnung der kodierenden Sequenz des CMV-Enhancerelements.....	53
2.2.2.3.2 Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Expression von Markergenen.....	54

2.2.3	RNA-Methoden	55
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus GSES-Zellen nach MACS-Aufreinigung	55
2.2.3.2	Reverse Transkription	55
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	55
2.2.4.1	Gesamt-Proteinextraktion und Proteinbestimmung.....	56
2.2.4.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.2.4.3	Western Blot.....	56
2.2.4.4	Immunmarkierung von Proteinen auf Western-Blot-Membranen.....	57
2.2.5	Zellkulturmethoden.....	57
2.2.5.1	Kultivierung der Zellen	57
2.2.5.2	Konservierung der Zellen	58
2.2.5.3	Transfektion mittels Elektroporation.....	58
2.2.5.4	Selektion mit Geneticinsulphat und Separation von Einzelklonen.....	59
2.2.5.5	Differenzierung der Zellen	59
2.2.5.6	Elektrophysiologische Messung von spontan schlagenden Zellen.....	59
2.2.6	Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)	60
2.2.6.1	Extrazelluläre Färbung	60
2.2.6.2	Intrazelluläre Färbung	61
2.2.6.3	Analytisches FACS	61
2.2.7	Magnetische Zellsortierung (MACS, Magnetic Activated Cell Sorting)	62
2.2.7.1	Zellvereinzelung	62
2.2.7.2	Markierung mit Hilfe des indirekten Antikörpersystems	63
2.2.7.3	Separation mittels Mini-MACS.....	63
2.2.7.4	Wiederausplattieren der Zellen nach magnetischer Zellsortierung	63
2.2.8	Konfokale Mikroskopie	64
 III. ERGEBNISSE.....		65
 3.1 Generierung eines Vektors zur kardial-spezifischen Expression von deletiertem CD4.....		65
3.1.1	Generierung des pCMV-Tbx5- Δ CD4-Vektors.....	66
3.1.1.1	Isolierung und Klonierung des CMV-Enhancers aus dem Vektor pEGFP-N1	66
3.1.1.2	Klonierung des Expressionsvektors pCMV-Tbx5- Δ CD4	66
 3.2 Generierung stabil transfizierter muriner ES-Zell-Klone mit dem Vektorkonstrukt pCMV-Tbx5-ΔCD4		68
 3.3 Überprüfung der Funktionalität des Expressionskonstruktes pCMV-Tbx5-ΔCD4...		69
3.3.1	Analyse der CD4-Expression der transfizierten Zellen	69
3.3.2	MACS-Aufreinigung der transfizierten Zellen.....	69
3.3.3	Nachweis der endogenen Tbx5-Expression mittels Western Blot	71
3.3.4	Nachweis der endogenen Tbx5-Expression mit immunhistochemischen Färbungen in der konfokalen Mikroskopie.....	72
 3.4 Charakterisierung der aufgereinigten Zellen.....		73
3.4.1	Genexpressionsanalyse der Zellklone auf mRNA-Ebene.....	73

3.4.1.1	Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich direkter Zielgene von Tbx5.....	73
3.4.1.2	Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich ihrer ventrikulären Spezifität	74
3.4.1.3	Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich Tbx5-beeinflussender Transkriptionsfaktoren	75
3.4.2	Nachweis normaler Sarkomermuster und interzellulärer Verbindungen der Tbx5-Klone mit immunhistochemischen Färbungen in der konfokalen Mikroskopie.....	75
3.4.3	Nachweis normaler elektrophysiologischer Aktivität der aufgereinigten Kardiomyozyten	77
IV. DISKUSSION.....		79
4.1	Regenerative Medizin als neuer Behandlungsansatz kardiovaskulärer Erkrankungen	79
4.2	Magnetische Zellaufreinigung kardialer Vorläuferzellen mit Hilfe des CMV-TBX5-ΔCD4-Vektorkonstruktes	83
4.2.1	Spezifische Aufreinigung embryonaler Stammzellen unter der Verwendung eines kardialen Promotorkonstruktes mittels magnetischer Zellsortierung	84
4.2.2	Überprüfung der kardialen Eigenschaften der aufgereinigten Zellen.....	84
4.3	Ausblick	87
4.3.1	Herstellung verschiedener spezifischer kardiovaskulärer Subtypen.....	87
4.3.2	Übertragung auf das humane System	88
4.3.3	Übertragung des Ansatzes auf andere ethisch unbedenkliche pluripotente Zellen.....	88
4.3.4	Optimale Zellapplikation und „Tissue Engineering“	89
V. ZUSAMMENFASSUNG.....		91
VI. LITERATURVERZEICHNIS.....		93
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....		106
DANKSAGUNG		109

Meinen Eltern

I. EINLEITUNG

1.1 Klinischer Hintergrund

1.1.1 Ischämische Herzerkrankungen und ihre weltweite Bedeutung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen heutzutage die mit Abstand häufigste Todesursache weltweit dar. Aufgrund der global steigenden Lebenserwartung ist davon auszugehen, dass sie auch zukünftig immer bedeutender werden. Die World Health Organisation prognostiziert aufgrund verbesserter medizinischer Versorgung- insbesondere in den Entwicklungsländern- eine starke Zunahme innerhalb der nächsten zwanzig Jahre; man erwartet einen weltweiten Anstieg von Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache von insgesamt 17,1 Mio. Menschen im Jahr 2004 auf 23,4 Mio. im Jahr 2030 [1].

In Deutschland lag 2008 bei 43% aller Todesfälle eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zugrunde [2]. Den größten Anteil an diesen Sterbefällen hatte die ischämische Herzkrankheit, deren relative Bedeutung auch weltweit weiter zunimmt [1].

Der ischämischen Herzkrankheit liegt zumeist eine Arteriosklerose der Koronararterien zugrunde, was im Verlauf zu einem Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und -angebot im Herzmuskel führt und sich klinisch in Angina-Pectoris-Beschwerden oder auch einem Myokardinfarkt äußern kann und später häufig in einer chronischen Herzinsuffizienz mündet.

Heutzutage liegt das Lebenszeitrisiko an einer Herzinsuffizienz zu erkranken bei ca. 20% [3]; die momentane Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland beläuft sich auf 130 000 pro Jahr und stieg in den letzten Jahren kontinuierlich weiter an. Die Ursache für die starke weltweite Zunahme der Herzinsuffizienz liegt paradoxerweise unter anderem an der verbesserten Behandlung von Herz- und anderen Krankheiten bei jüngeren Patienten, so dass die Herzinsuffizienz als Langzeitfolge verstärkt im höheren Lebensalter auftreten kann.

Die Schwere der Herzinsuffizienz wird üblicherweise in vier Stadien eingeteilt (NYHA-Stadium I-IV; New York Heart Association). Die Prognose der Krankheit ist sehr stark abhängig vom Ausmaß des strukturellen Herzschadens und der klinischen Symptomatik: in den Stadien I und II beläuft sich die jährliche Sterblichkeit auf 8-18%; in den Stadien III und IV steigt sie auf über 50% an [4]. Die momentanen Behandlungsmöglichkeiten einer chronischen Herzinsuffizienz beinhalten medikamentöse Therapien und im terminalen Stadium die Implantation eines Linksherz-Unterstützungssystems (LVAD) als Überbrückungstherapie. Die bisher einzige längerfristig erfolgreiche Therapie der terminalen Herzinsuffizienz ist die Herztransplantation. Mit Überlebensraten von 80% nach einem Jahr (70% nach fünf Jahren und 50% nach zehn Jahren) ist sie bisher allen anderen Therapieverfahren überlegen und daher nach wie vor Goldstandard in der

Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz [5]. Trotzdem birgt die Herztransplantation große Risiken- das transplantierte Herz ist als Fremdorgan ständig in Gefahr, vom Immunsystem des Empfängers abgestoßen zu werden; daher benötigt der Organempfänger eine lebenslange kontinuierliche Immunsuppression, welche jedoch mit einem stark erhöhten Infektionsrisiko sowie einem erhöhtem Risiko an Malignomen einhergeht. Aktuell liegt der Median der Überlebensraten von Patienten nach einer Herztransplantation bei ca. 10 Jahren [6].

Das größte Problem der Herztransplantation ist jedoch der Mangel an Spenderorganen. Im Jahr 2009 wurden in Deutschland insgesamt 363 Herzen transplantiert, denen ein dringender Bedarf von 973 Herzen gegenüberstand [7]. Dabei nahm die Anzahl der verfügbaren Spenderorgane in den letzten Jahren eher ab, während der Bedarf an Spenderherzen aufgrund der steigenden Patientenzahlen weiterhin deutlich zunimmt. Während der Wartezeit auf ein geeignetes Herz versterben im Schnitt 25% der Patienten [8]. Diese Versorgungslücke, die aufgrund der weltweiten Zunahme der ischämischen Herzkrankheit immer größer wird, gilt es zukünftig mit Alternativen zur herkömmlichen Herztransplantation zu schließen.

1.2 Stammzelltherapeutische Ansätze als zukünftige Alternativen zur Herztransplantation

Das Herz ist- anders als beispielsweise die Leber oder Skelettmuskelzellen- sehr begrenzt in seiner Möglichkeit, sich selbst zu regenerieren. Auch wenn ein geringer Prozentsatz der Kardiomyozyten wohl proliferative Eigenschaften hat, so sind diese bei größeren kardialen Schäden längst nicht ausreichend [9]. Bei einem Myokardinfarkt gehen beispielsweise durchschnittlich eine Milliarde oder mehr Herzmuskelzellen zugrunde und werden später durch nicht-kontraktilen Narbengewebe ersetzt, was oft den Beginn von späterem Herzversagen im Rahmen einer terminalen Herzinsuffizienz darstellt [10]. Die meisten Therapieansätze beim vorgeschädigten Herzen zielen darauf ab, die Restfunktion des Herzens zu unterstützen und weitere kardiale Schädigungen- soweit es möglich ist- zu verhindern. Eine kausale und langfristige Therapie im Sinne einer Wiederherstellung des Myokards gibt es- mit Ausnahme der allogenen Herztransplantation- in der klinischen Anwendung jedoch bisher nicht.

Aus diesem Grund und den in (1.1.1) beschriebenen Limitationen der Herztransplantation war ein Hauptziel der Forschung in den letzten Jahren, untergegangene Herzmuskelzellen durch Zellen zu ersetzen, welche die Funktion von Kardiomyozyten optimalerweise übernehmen sollten. Eine zentrale Frage war und ist bei diesem Ansatz, welche Art von Zellen die kardiale Regeneration maximal unterstützen könnte. Die naheliegendste Lösung wäre die untergegangenen Herzmuskelzellen durch Kardiomyozyten selbst zu ersetzen [11].

Aus diesem Grund wurden in frühen präklinischen Studien zur kardialen Zelltherapie bevorzugt terminal-differenzierte Kardiomyozyten aus embryonalen, fetalen und neonatalen Herzen verwendet [12-17]. Diese Studien bildeten ein entscheidendes Fundament für die weitere Forschung, da sie als „*Proof-of-Principle*“ zeigen konnten, dass implantierte Kardiomyozyten unter Beibehalten ihres kardialen Phänotyps (inklusive Sarkomerstrukturen und Gap-Junction-Proteine) stabile, intrakardiale Transplantate bilden können und zu einer Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion führen [11]. Im Vergleich dazu zeigten adulte Kardiomyozyten nur sehr geringe Überlebensraten nach der Transplantation [18], was darauf hindeutet, dass weniger reife Kardiomyozyten offensichtlich Charakteristika mit sich bringen, die dazu führen, dass sie sich besser in der fremden Transplantumgebung adaptieren können [11]. Praktische Erwägungen wie die Beschaffung der oben genannten Kardiomyozyten und insbesondere die ethische Problematik, diese Kardiomyozyten in großen Mengen bereitstellen zu können, machen es jedoch unmöglich, fetale oder neonatale Kardiomyozyten in der Klinik anwenden zu können [11].

Es müsste daher ein alternativer Zelltyp gefunden werden, welcher zwei Mindestkriterien erfüllen sollte:

1. Die Bereitstellung der gewünschten Zellen in unbegrenzten oder zumindest sehr großem Ausmaß, um eine genügend große Zellzahl für die Transplantation zu erhalten
2. Das Vorliegen eines kardialen Zelltyps, um die Integration in das kardiale Fremdgewebe zu ermöglichen

Diesbezüglich wurden in den letzten Jahren die verschiedensten Zellen in präklinischen und klinischen Studien hinsichtlich ihrer Eignung untersucht. Die Zellen, die dabei vor allem in Betracht kamen, waren adulte Progenitorzellen aus dem Knochenmark und den Skelettmuskelzellen, embryonale Stammzellen und die relativ neu entwickelten induzierten pluripotenten Stammzellen, für deren Entdeckung im Oktober 2012 Shinya Yamanaka der Medizin-Nobelpreis verliehen wurde. Diese Zellen und ihr therapeutisches Potential sollen in den folgenden Abschnitten genauer beleuchtet werden.

1.3 Adulte und embryonale Stammzellen

1.3.1 Definition von Stammzellen

Zu Stammzellen werden die verschiedensten Arten von Zellen gezählt, die per Definition bestimmte Eigenschaften gemeinsam haben:

1. Immortalität bzw. die Fähigkeit zur unlimitierten Selbsterneuerung. Hierbei bleibt die Zelle auch nach vielen Zyklen der Zellteilung in ihrem undifferenzierten Zustand („*Self-renewal*“) [19].
2. Die Fähigkeit, sich in einen spezialisierten Zelltyp zu differenzieren [19].

Die verschiedenen existierenden Stammzellarten stellen keine homogene Zellquelle dar, sondern sind eher als ein Entwicklungskontinuum zu verstehen, welches physiologischerweise von Zellen während der Embryonalentwicklung durchlaufen wird (s. Bild I-1). Die ursprünglichste Stammzelle ist die totipotente Stammzelle, welche die Fähigkeit hat, sich zu einem kompletten Embryo (inklusive Plazenta und Nabelschnur) zu entwickeln [20]. Dieser Zustand der Totipotenzen ist allerdings von nur sehr kurzer Dauer- er beginnt mit der Befruchtung der Eizelle und dauert etwa bis zum Achtzellstadium der Morula an [21]. Mit den darauffolgenden Zellteilungen verlieren die Zellen ihre Fähigkeit, einen vitalen Organismus zu bilden; sie können sich nur noch in alle Zellen der drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) sowie Keimzellen differenzieren und werden als pluripotent bezeichnet [20, 21]. In diesem Stadium der Pluripotenzen können aus der Blastozyste pluripotente, embryonale Stammzellen gewonnen werden. Werden diese undifferenzierten ES-Zellen transplantiert, können sie in vivo gutartige Teratome produzieren, was als Beweis ihrer Pluripotenzen dient [22]. Im Verlauf der Embryonalentwicklung verlieren die Zellen weiteres Differenzierungspotential und können sich nur noch in bestimmte Zellen entwickeln. Dieser Zustand wird als multipotent bezeichnet und stellt die Eigenschaft von adulten Stammzellen (auch als Progenitorzellen oder somatische Stammzellen bezeichnet) dar; diese Zellen sind in der Lage, sich auch bei einem adulten Organismus im Laufe seines Lebens immer wieder selbst zu erneuern und differenzierte Tochterzellen zu generieren. Die Differenzierung kann jedoch nur in festgelegte Zelltypen der Keimblattlinie, welcher sie selbst angehören, stattfinden.

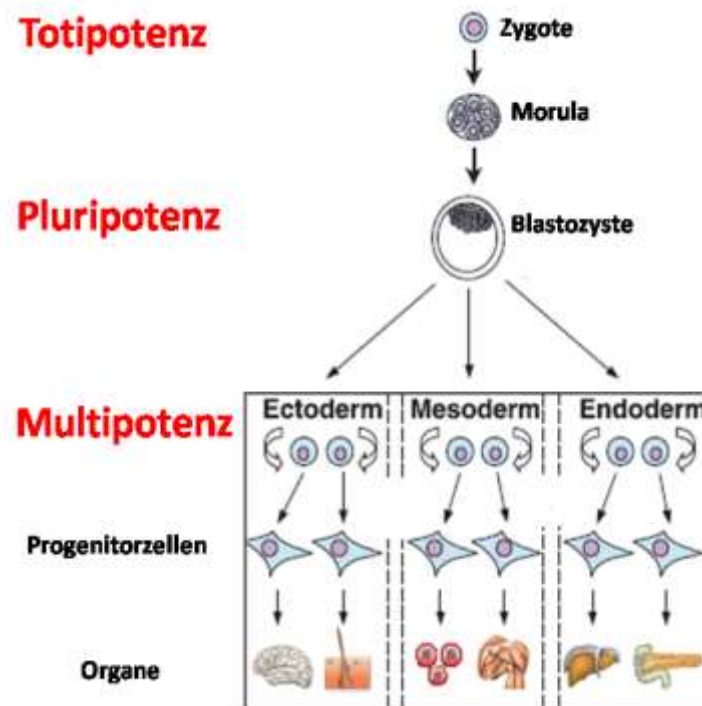


Bild I-1 Stammzellhierarchie

Zygote und frühe Zellteilungsstadien bis zum Achtzellstadium der Morula werden als totipotent definiert, da sie einen vitalen Organismus bilden können. Im Blastozystenstadium können sich die Zellen der inneren Zellmasse in alle Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) und Keimzellen entwickeln. Im adulten Gewebe verbleiben multipotente Progenitorzellen, um geschädigte Zellen zu ersetzen (modifiziert nach ([21])).

Adulte Stammzellen können in zahlreichen Organen bzw. Organsystemen nachgewiesen werden, wo sie lebenslang verbleiben, um Ersatzzellen zu bilden und somit den Grundumsatz an Zellen gewährleisten. Wichtige adulte Stammzellen sind insbesondere Stammzellen aus dem Knochenmark und gewebeständige Stammzellen wie Skelettmyoblasten. Da allerdings bei adulten Stammzellen die Eigenschaft der Pluripotenz- und damit Fähigkeit, beliebige Gewebearten auszubilden- fehlt und zudem das Ausmaß der möglichen Differenzierung nicht klar umschrieben ist, ist der Begriff „Stammzelle“ leicht irreführend und wird daher im folgenden Abschnitt durch den Ausdruck „Progenitorzelle“ ersetzt. Inwieweit Progenitorzellen hinsichtlich kardialer Zelltherapie geeignet sind, soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.3.2 Progenitorzellen und ihre Limitation hinsichtlich kardialer Zelltherapie

Die ersten Forschungsansätze, vorgeschädigtes Myokard zu regenerieren, arbeiteten bevorzugt mit adulten Progenitorzellen, da bei ihnen- anders als bei embryonalen Stammzellen- keine ethischen Bedenken vorlagen. Außerdem hatten adulte Progenitorzellen den Vorteil, in relativ großem Ausmaß im Patienten selbst vorhanden zu sein und stellten damit eine potentielle autologe Zellquelle dar.

1.3.2.1 Skelettmuskelspezifische Progenitorzellen

Skelettmuskeln besitzen - anders als das Herz - reichlich skelettmuskelspezifische Vorläuferzellen (auch Satellitenzellen oder Myoblasten genannt), welche bei Muskelverletzungen zerstörte Skelettmuskelzellen ersetzen können.

Eine der großen Hoffnungen der kardialen Zelltherapie war daher, in einer kardialen Umgebung bei skelettmuskelspezifischen Progenitorzellen eine Transdifferenzierung in Kardiomyozyten bewirken zu können. Die ersten Experimente bestanden darin, im Tiermodell Satellitenzellen in ein infarziertes Myokard zu transplantieren, um eine Transdifferenzierung der Myoblasten in Kardiomyozyten zu erwirken. Wiederholt konnte zunächst in verschiedenen Tierexperimenten eine positive Auswirkung auf die Herzfunktion festgestellt werden [23, 24]; es zeigte sich jedoch in weiteren Untersuchungen, dass die transplantierten Zellen sich zwar in das infarzierte Herz integrierten, anschließend aber eine Ausdifferenzierung zu Skelettmuskelzellen- und nicht zu Herzmuskelzellen- stattfand [25]. Darüber hinaus konnte keine elektromechanische Kopplung der transplantierten Zellen mit den umliegenden kardialen Zellen festgestellt werden [26]. Somit war die positive Auswirkung auf die Herzfunktion in den Tierexperimenten kausal nicht klar verstanden und wurde später beispielsweise durch parakrine Effekte erklärt [27]; die anfänglich erhoffte Transdifferenzierung von Skelettmuskelzellen in Herzmuskelzellen schien jedoch nicht stattzufinden [28, 29]. Eine große, randomisierte doppelblinde klinische Studie aus dem Jahr 2008 von Menasche et al. mit Satellitenzellen konnte nach einer Follow-up-Dauer von sechs Monaten keine Verbesserung der Herzfunktion zeigen [30]. Zusätzlich entwickelten in den klinischen Studien einige Probanden schwere Arrhythmien [30-32], so dass man heute aufgrund der Datenlage und der potentiellen Patientengefährdung von den Skelettmuskelprogenitorzellen als Zellquelle für eine kardiale Zelltherapie abgekommen ist.

1.3.2.2 Progenitorzellen aus dem Knochenmark

Adultes Knochenmark besteht aus hämatopoetischen, mesenchymalen, stromalen und weiteren Stammzellen, welche in zahlreichen Experimenten und Studien bezüglich ihres Potentials einer kardialen Regeneration untersucht wurden. 2001 wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen tierexperimentelle Ergebnisse veröffentlicht, die eine Transdifferenzierung von Knochenmarksprogenitorzellen in Kardiomyozyten nach Transplantation in infarziertes Myokard nahelegten [33, 34]. Diese ermutigenden Ergebnisse wurden jedoch durch spätere Arbeiten in Frage gestellt, die zeigten, dass die transplantierten Zellen nicht den erwünschten kardiomyozytären Phänotyp annehmen, sondern vielmehr ihren hämatopoetischen Phänotyp behalten [35, 36]. In Folgeuntersuchungen stellten sich die ursprünglich angenommenen Transdifferenzierungen in Kardiomyozyten eher als Zellfusion der transplantierten Zellen mit den kardialen Empfängerzellen

len denn als echte Kardiomyozytenbildungen heraus [37-39]. Spätere klinische Studien, welche den Nutzen von Knochenmarksinfusionen nach Myokardinfarkt untersuchten, brachten in den letzten Jahren sowohl negative als auch positive Ergebnisse hervor und waren damit insgesamt recht widersprüchlich [40-44]. Unumstritten ist jedoch, dass Progenitorzellen aus dem Knochenmark nicht das ursprünglich erhoffte Differenzierungspotential besitzen und zugrundegegangene Kardiomyozyten nicht funktionell ersetzen können, sondern nur im besten Fall durch diskutierte Mechanismen wie einem günstigeren Remodelling des Narbengewebes [45, 46], Neoangiogenese [47] oder parakrine Effekte [48-50] eine kardiale Regeneration unterstützen könnten.

Die Erfahrungen in den klinischen Studien- hier am Beispiel der Progenitorzellen aus dem Knochenmark und der Myoblasten veranschaulicht- deuten darauf hin, dass diese Zellen im besten Fall einen nur geringen positiven Effekt auf die Zellregeneration im Herzen haben und offensichtlich nicht in der Lage sind, in Kardiomyozyten zu transdifferenzieren. Aufgrund der offensichtlichen Limitationen der adulten Progenitorzellen für die kardiale Zelltherapie sind pluripotente Stammzellen mit ihrem unbestreitbaren Differenzierungspotential in die verschiedensten Gewebearten wieder verstärkt in das Hauptaugenmerk der Forschung gerückt.

1.3.3 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen konnten 1981 von verschiedenen Arbeitsgruppen erstmalig aus Mäuseblastozysten isoliert werden [51, 52] und wurden später auch aus vielen anderen Spezies (z.B. Ratte, Hase, Hamster, Hund, Schaf, Rhesusaffe) gewonnen [53]. Es gelang aber erst 1998- fast zwanzig Jahre später- den Kollegen Thomson et al., humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen) aus einem Präimplantationsembryo zu isolieren [54].

Um eine stabile Stammzelllinie zu generieren, werden ES-Zellen im Stadium der Pluripotenz aus der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste am Tag 5-7 der Differenzierung gewonnen; diese innere Zellmasse wird isoliert, kultiviert und anschließend mehrfach passagiert. Auf diesem Weg erhält man embryonale Stammzellen mit mehr oder weniger unbeschränkter Proliferationskapazität in vitro [55], einem stabilen Karyotyp [56] und pluripotenten Eigenschaften (siehe 1.3.1) [57].

ES-Zellen, die auf diese Weise isoliert wurden, können sich nachweislich in alle Zellarten der drei Keimblätter entwickeln (beispielsweise Adipozyten [58], Astrozyten [59, 60], Chondrozyten [61], Pankreaszellen [62-64], Hepatozyten [65-67], Skelettmuskelzellen [68]) und in Kardiomyozyten [69-72]. Darüber hinaus sind sie in der Lage, Zellen der Keimzelllinien zu bilden [73-75] (s. Bild I-2).

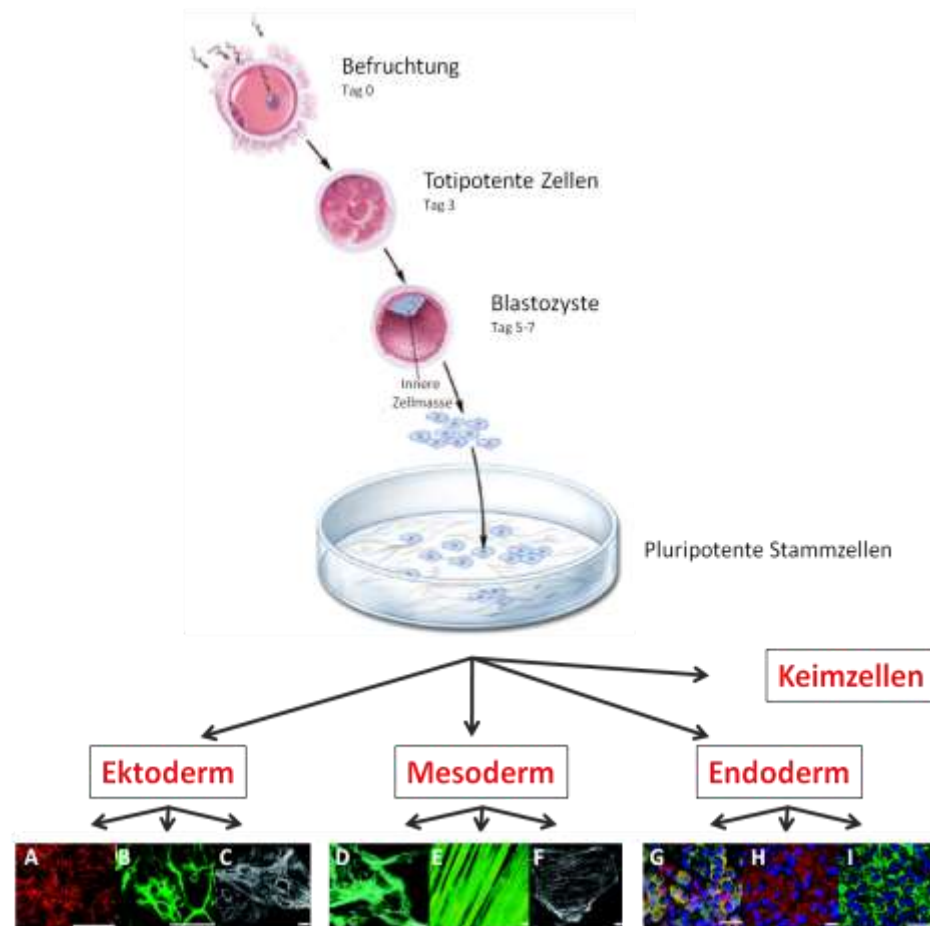


Bild I-2 Isolierung und in-vitro-Differenzierung von ES-Zellen

Nach Isolierung und Kultivierung der inneren Zellmasse aus der Blastozyste am Tag 5-7 werden pluripotente Stammzellen isoliert, welche sich zu differenzierten Zellen aller drei Keimblätter und Keimzellen entwickeln können (A: Neurone; B: Gliazellen; C: Epithelzellen; D: Kardiomyozyten; E: skelettale Myozyten; F: glatte Myozyten; G: Pankreaszellen; H, I: Hepatozyten) (modifiziert nach [21, 76]).

Die proliferativen Eigenschaften und das Differenzierungspotential von ES-Zellen versprechen eine im Wesentlichen unbegrenzte Bereitstellung von spezifischen Zelltypen für die Grundlagenforschung, Medikamententestungen [77, 78] und Transplantationstherapien- beispielsweise durch die Gewinnung dopaminerger Zellen bei Parkinson [79, 80], Inselzellen bei Diabetes [81-83] bis hin zur Transplantation von Herzmuskelzellen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz.

1.3.3.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Die Pluripotenz von embryonalen Stammzellen bleibt nur so lange erhalten, wie sich die Zellen in ihrem ursprünglichen, nicht entwickelten („undifferenzierten“) Zustand befinden. Daher war es zunächst eine große Herausforderung in der Stammzellforschung, die Spontandifferenzierung von Stammzellen zu hemmen.

Als Standardmethode wurde die Kultivierung mit inaktivierten Mäusefibroblasten- sogenannten „Feederzellen“ (MEFs)- entwickelt, auf denen die Stammzellen ausplattiert werden und die durch den direkten zellulären Kontakt und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren die Differenzierung der ES-Zellen inhibieren können [84].

Murine Stammzellen lassen sich mit Hilfe von Zytokinen wie LIF (Leukemia Inhibitory Factor) auch ohne Einsatz von Feederzellen undifferenziert kultivieren und vermehren [85-90].

Für humane ES-Zellen wurden in den letzten Jahren ebenfalls verschiedene alternative Methoden etabliert wie z.B. die Anzucht auf humanen Fibroblasten [91, 92], adulten Epithelzellen [93], Zellen der Vorhaut [94] und durch Kultivierung auf extrazellulären Matrices [95]. Neue Methoden versuchen humane ES-Zellen komplett ohne fremdes biologisches Material wie „Feederzellen“ oder fetalem Rinderserum (FCS) zu kultivieren [96], um den hygienischen und immunologischen Anforderungen gerecht zu werden, die bezüglich der therapeutischen Verwendung am Menschen gestellt werden [97] und bilden somit den ersten Schritt zur klinischen Anwendbarkeit von humanen ES-Zellen.

1.3.4 Pluripotente Stammzeleigenschaften und alternative Generierung pluripotenter Stammzellen

Die Identifizierung von Oberflächenmarkern, Transkriptionsfaktoren und anderen biologischen Charakteristika hat einen wichtigen Beitrag geleistet, um auf molekularer Ebene definieren zu können, unter welchen Bedingungen eine Zelle eine pluripotente „Stamm“-Zelle ist [21]. Undifferenzierte hES-Zellen exprimieren typische Oberflächenmarker, die für Primaten-ES-Zellen charakteristisch sind wie SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 und Tra-1-81 [21, 54, 98, 99]; mES-Zellen beispielsweise SSEA1 [100]. Daneben weisen sowohl humane als auch murine ES-Zellen eine hohe alkalische Phosphataseaktivität [54, 101] und eine hohe Telomeraseaktivität [54, 102] auf [21]. Wichtige Transkriptionsfaktoren, die von murinen und humanen ES-Zellen exprimiert werden, sind Oct3/4 [103, 104], Sox2 [105] und Nanog [21, 106]. Sie gelten als Schlüsselfaktoren für die Kontrolle und das Aufrechterhalten der Pluripotenz in ES-Zellen [107, 108] und werden während der Differenzierung herunterreguliert [21].

Diese molekularbiologischen Erkenntnisse führten dazu, dass es 2006 der Arbeitsgruppe um Takahashi und Yamanaka gelang, mittels retroviraler Einschleusung von vier Pluripotenzfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc) somatische Zellen in einen stammzellgleichen, pluripotenten Zustand zu sogenannten iPS-Zellen (induzierte pluripotente Stammzellen) zu reprogrammieren [109] (s. Bild I-3). Für die Entdeckung der iPS-Zellen wurde Yamanaka im Oktober 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

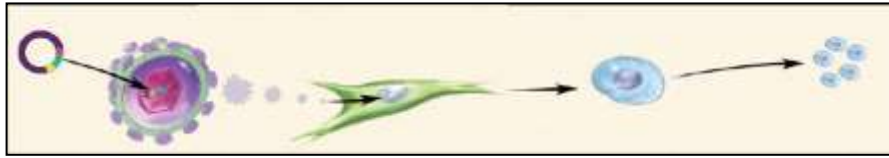


Bild I-3 Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) nach Takahashi et al. [109]

Mittels retroviraler Einschleusung von vier Pluripotenzfaktoren werden Mäusefibroblasten reprogrammiert und anschließend wie herkömmliche ES-Zellen kultiviert, um eine pluripotente iPS-Zelllinie zu generieren (modifiziert nach [110]).

Als somatische Zellquelle dienten dabei zunächst Mäusefibroblasten [109]; später wurden auch humane Hautfibroblasten verwendet [111].

Etwa zeitgleich zur Arbeitsgruppe Yamanaka gelang es auch der Arbeitsgruppe Yu et al., humane iPS-Zellen mit Hilfe der Faktoren Oct3/4, Sox2, Nanog und Lin28 zu generieren [112]. Die bisher generierten iPS-Zelllinien verhalten sich- nach dem momentanen Wissensstand- sehr ähnlich zu ES-Zellen bezüglich Morphologie, Proliferation, Genexpressionsmuster und Differenzierungspotential in vitro und in vivo [111, 112]. Inzwischen konnten aus den verschiedensten somatischen Zelltypen iPS-Zellen generiert werden- beispielsweise aus Maushepatozyten [113], Pankreaszellen [114], humanen Keratinozyten [115] und humanen Knochenmarkszellen [116].

Trotz allem sind die ursprünglich verwendeten Reprogrammierungsmethoden sehr ineffizient; weniger als 1% der ursprünglich adulten Zellen lassen sich zu iPS-Zellen generieren [117, 118]. Verschiedene Forschungsansätze beschäftigten sich zur Zeit vor allem damit, die Reprogrammierung effizienter zu gestalten und schädliche Nebeneffekte des Reprogrammierungsprozesses zu verringern oder auszuschalten.

Da die retrovirale Einschleusung der vier Faktoren in den frühen Studien potentiell mutagen war, wurde versucht, diese Faktoren auszuschalten. Insbesondere ist das Onkogen c-Myc dafür bekannt, Tumorstadium zu fördern, was ein großes Risiko für eine Transplantationstherapie darstellen würde. Es zeigte sich, dass iPS-Zellen aus embryonalen Mäusefibroblasten mit nur drei Faktoren generiert werden können (Esrrb, Oct4, Sox2) [119], so dass man davon ausgeht, dass c-Myc für eine direkte Reprogrammierung von Mäusefibroblasten entbehrlich ist [120]. Inzwischen konnte die Anzahl der Gene, welche für die Reprogrammierung benötigt werden, auf ein bis zwei Gene verringert werden [121-125] und man ist dabei, eine Reprogrammierung in Abwesenheit der genetischen Integration eines viralen Vektors zu ermöglichen [126-130], um damit das Tumorrisko von iPS-Zellen zu verringern [129]. Um die Anwendung genetischer Materialien ganz zu umgehen, etablierten Zhou et al. erstmals mit Hilfe rekombinanter und reprogrammierenden Proteinen die Generierung Protein-induzierter pluripotenter Stammzellen (piPSCs) aus murinen Fibroblasten [131]. Später konnten mit Hilfe von reprogrammierenden

Proteinen, miRNA-Transfektionen und modifizierter RNA auch humane iPS gewonnen werden [132-135].

Trotz allem ist ein Hauptproblem nach wie vor die geringe Effizienz der Generierung und eine verstärkte genetische Alteration von iPS-Zellen [136-139]. Dennoch haben iPS-Zellen großes Potential als Zellquelle für kardiale Zellen- es konnten funktionelle Kardiomyozyten sowohl aus murinen [140-142] als auch aus humanen [143] iPS-Zellen gewonnen werden, welche ursprünglich aus Fibroblasten generiert worden waren.

Eine unbestreitbare Errungenschaft von iPS-Zellen ist insbesondere ihr Potential, patientenspezifische Zelllinien zu generieren und so völlig neue Forschungswege- vor allem auf dem Gebiet einer individuellen Medikamententestung- zu eröffnen. So gelang es 2010 der Arbeitsgruppe um Karl-Ludwig Laugwitz bei zwei Patienten mit Long-QT-Syndrom, Fibroblasten aus der Haut zu entnehmen, diese zu iPS-Zellen zu reprogrammieren und anschließend in kardiale Myozyten differenzieren zu lassen, welche die erwarteten Charakteristika ihrer Erkrankung aufwiesen [144].

Demnach konnte mit iPS-Zellen zum derzeitigen Stand der Forschung ein „*Proof-of-Principle*“ gezeigt werden, aber dennoch bedarf es einer deutlich intensiveren Charakterisierung der generierten Zelllinien- insbesondere der genauen Evaluation ihres mutagenen Risikos, bevor eine direkte Anwendung am Menschen möglich erscheint.

1.3.4.1 Kardiale Differenzierung von Stammzellen

ES-Zellen haben unbestreitbar das Potential zur kardialen Differenzierung. Eine Differenzierung von mES-Zellen in vitro kann initiiert werden durch die Kultivierung der Zellen in Abwesenheit von selbsterneuernden Signalen wie LIF oder „*Feederzellen*“. Nach Entzug von LIF oder Entfernen der Feeder-Schicht aus Mausfibroblasten werden die mES-Zellen in einer Suspensionslösung kultiviert und formieren sich dabei zu Zellaggregaten- sogenannten „*Embryoid Bodies*“ (EBs) [51, 69]. Für eine fortschreitende Differenzierung der EBs werden diese auf einer Matrix ausplattiert. Ein bis vier Tage später kann man rhythmisch kontrahierende Areale in den kultivierten EBs erkennen. In ähnlicher Weise wie im Mausmodell beginnen auch hES-Zellen sich in EBs zu differenzieren, sobald sie von der Feederschicht der Mausfibroblasten entfernt werden. Kehat et al. konnten als Erste die spontane Differenzierung von hES-Zellen in Kardiomyozyten zeigen [145] wobei nach dem Ausplattieren der EBs ca. 8% der Zellen rhythmisch kontrahierende Areale bildeten. Diese spontane, EB-basierte Differenzierung zu Kardiomyozyten ist die Standardmethode, mit welcher die meisten Forscher kardiale Differenzierung von ES-Zellen initiieren [145, 146]. Allerdings ist dieses System durch die relative geringe Ausbeute an Kardiomyozyten und seine heterogene, undefinierte und ungerichtete Natur limitiert.

Die aus murinen und humanen ES-Zellen gewonnenen Kardiomyozyten haben wesentliche molekulare, morphologische, strukturelle und funktionelle Charakteristika von nativen Kardiomyozyten. Sie exprimieren wesentliche kardial-spezifische Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Nkx2.5, Gata4, Mef2c und die T-box Transkriptionsfaktoren Tbx5 und Tbx20 in einem ähnlichen zeitlichen Ablauf wie in der in-vivo-Entwicklung [11, 145-149]. Außerdem exprimieren sie Sarkomerproteine (beispielsweise α -Aktinin, kardiales Troponin I- und T, sarkomerisches MHC, atriale und ventrikuläre MLC und Desmin) [11, 145, 146, 149] und andere kardiale oder muskel-spezifische Proteine wie ANP, CK-MB und Myoglobin [11, 145, 146]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von hES-Zellen zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten zeigen eine zunehmende strukturelle kardiale Reifung von einer unregulären Myofilamentanordnung hin zu einer sarkomerischen Struktur mit Z-Scheiben [147, 148]. Immunzytochemische Untersuchungen zeigen Connexine und Cadherine in den Gap-Junctions benachbarter Zellen [150, 151]. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass sowohl aus murinen als auch aus humanen ES-Zellen gewonnene Kardiomyozyten Aktionspotentiale aufweisen, die den verschiedenen kardialen Subtypen (Schrittmacherzellen, atriale- und ventrikuläre Herzmuskelzellen) entsprechen [11, 70, 152]. Studien mit Mikroelektrodenarrays (MEA) bewiesen die Entwicklung eines kardialen funktionellen Synzytiums in schlagenden EBs mit spontaner Schrittmacheraktivität und Aktionspotentialausbreitung und unterstreichen damit auch das große Potential der Stammzellen-neben der Eignung für Transplantationsstudien- auch beispielsweise für kardiales elektrophysiologisches Medikamentenscreening [153, 154].

1.4 Embryonalentwicklung des Herzens

Embryonale Stammzellen durchlaufen während ihrer Differenzierung in-vitro die Stationen der Embryonalentwicklung auf Zellebene. Aus diesem Grund ist das Verständnis der Embryonalentwicklung des Herzens in vivo- hier am Beispiel der murinen Herzentwicklung dargestellt- eine wichtige Voraussetzung, um die in-vitro Kardiovaskulogenese von ES-Zellen molekularbiologisch in Bezug auf Differenzierungsverhalten, Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden nachvollziehen zu können.

Das Herz ist das erste Organ, das sich in Vertebraten entwickelt und hat eine zentrale Rolle bei der Verteilung von Nährstoffen und Sauerstoff im heranwachsenden Embryo.

Die Herzentwicklung von Vertebraten benötigt für eine reibungslose Kardiogenese zwei Herzvorläuferpopulationen, welche sich während der Gastrulation (d. h. der Entwicklung der drei Keimblätter- Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) herausbilden- das erste und das zweite Herzfeld [155]. Aus dem Embryoblasten entsteht während der Implantation zunächst eine zweiblättrige Keimscheibe, bestehend aus dem Epiblast- aus welchem sich später die drei Keimblätter entwickeln- und dem Hypoblast. Die anschließende Gastrulation beginnt mit der Bildung des Primitivstreifens. Epiblastenzellen durchwandern den Primitivstreifen und erhalten dabei auf ihrem Weg von proximal nach distal Signale von umliegenden Zellen, welche über ihren zukünftigen Zellcharakter (d.h. endodermal oder mesodermal) entscheiden. Die zurückbleibenden Zellen des Epiblasten bilden das Ektoderm [156]. Die ersten Zellen, die in den Primitivstreifen einwandern und einen mesodermalen Zellcharakter annehmen, exprimieren den Transkriptionsfaktor MesP1 (Mesoderm Posterior 1) und werden als früheste Herzvorläuferzellen bezeichnet [157, 158].

Diese MesP1-exprimierenden Zellen bilden die zwei Herzvorläuferzellpopulationen- das erste Herzfeld und das zweite Herzfeld [159]. Die mesodermalen Herzvorläuferzellen des ersten und des zweiten Herzfeldes wandern als bilaterale mesodermale Flügel aus der Primitivleiste zur späteren Herzregion [155]. Dabei bilden die Zellen des ersten Herzfeldes den Herzbogen, während die Zellen des zweiten Herzfeldes sich dorso-medial zum Herzbogen ansiedeln [155, 160] (s. Bild I-4). Anschließend expandieren die Vorläuferzellen beider Herzfelder und migrieren zur Mittellinie, an welcher sie fusionieren und ein lineares Herzrohr bilden (E7.5-E8). Im linearen Herzrohr differenzieren Zellen des ersten Herzfeldes in Kardiomyozyten des primitiven Ventrikels (pV), welcher sich später zum linken Ventrikel (LV) weiterentwickelt [155, 160], während die Zellen des zweiten Herzfeldes ihren Vorläuferzellcharakter behalten und sich dorsal zum primitiven Ventrikel ansiedeln (s. Bild I-4). In der Region des Herzschauches, in der sich später der linke Ventrikel entwickelt, können bereits zwischen E8-E8.5 Markergene für ventrikuläre Kammerbildung wie Nppa und Cx40 nachgewiesen werden [160]. Zwischen E8.35-E9.5

proliferieren die Zellen des zweiten Herzfeldes sehr stark, wandern in den primitiven Ventrikel ein und initiieren dort die Windung des Herzens (E8.5-E9.0). Sie differenzieren in Kardiomyozyten des Ausflusstraktes (OFT), des rechten Ventrikels (RV) und beider Vorhöfe (RA, LA) [155, 160] (s. Bild I-4).

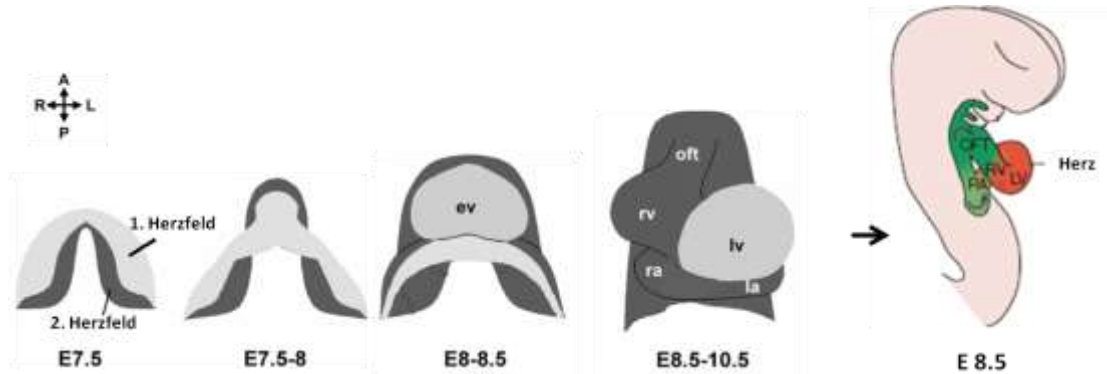


Bild I-4 Schematische Übersicht der Kardiogenese am Beispiel der Maus aus den Vorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes

Vorläufer des embryonalen Ventrikels (ev)- des zukünftigen linken Ventrikels (lv)- stammen vom ersten Herzfeld ab, während die Vorläuferzellen des Ausflusstraktes (oft), des rechten Ventrikels (rv), des rechten Vorhofes (ra) und des linken Vorhofes (la) vom zweiten Herzfeld abstammen. A, anterior; L, links, R, rechts, P, posterior. (modifiziert nach [155, 160]).

Das Nicht-Kammer-Myokard exprimiert dabei als spezifischen Marker den Transkriptionsfaktor Tbx2 und ist an der Entwicklung des kardialen Reizleitungssystems beteiligt [155]. Die Bildung eines interventrikulären Septums zwischen rechten und linken Ventrikel wird zwischen E9.5-10 initiiert, begleitet von der Differenzierung und Expansion beider Kammern [160]. Die Entwicklung eines funktionstüchtigen vierkammerigen Herzens ist an E13.5 abgeschlossen.

Die Entwicklung auf zellulärer Ebene von einer pluripotenten Stammzelle zu einer ausgereiften Herzmuskelzelle kann anhand der Expression typischer, entwicklungsspezifischer Transkriptionsfaktoren nachvollzogen werden. So exprimiert beispielweise eine noch pluripotente Stammzelle Transkriptionsfaktoren wie Nanog oder Oct4; im kardialen Mesoderm werden Transkriptionsfaktoren wie Mesp1 oder Isl1 exprimiert. Kardiale Vorläuferzellen exprimieren Nkx2.5, Gata4 oder Tbx5; in reifen Kardiomyozyten lassen sich unter anderem α -Actinin oder MHC nachweisen [9] (Bild I-5).



Bild I-5 Zeitlicher Ablauf der kardialen Entwicklung von einer pluripotenten Stammzelle zu einer ausgereiften Herzmuskelzelle

Das frühe Mesoderm differenziert zunächst zum kardialen Mesoderm, dann zu kardialen Vorläuferzellen bis hin zu reifen Kardiomyozyten. Es sind jeweils typische Marker der einzelnen Entwicklungsstufen aufgeführt (modifiziert nach [9]).

1.5 Der kardiale Transkriptionsfaktor Tbx5

Während der Kardiogenese spielen Interaktion, Aktivierung und Repression von Transkriptionsfaktoren für die korrekte Herzentwicklung eine entscheidende Rolle. Der Transkriptionsfaktor T-Box 5 (Tbx5), dessen Promotor im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit verwendet wurde, nimmt eine Schlüsselstellung in der kardialen Entwicklung ein und soll im Folgenden besprochen werden.

1.5.1 Tbx5 als Mitglied der T-Box-Genfamilie

Die T-Box (Tbx)-Genfamilie kommt in allen Metazoen vor und wird in fünf Unterfamilien unterteilt, wobei Tbx5 zur Tbx2-Unterfamilie zugehörig ist [161] (s. Bild I-6).

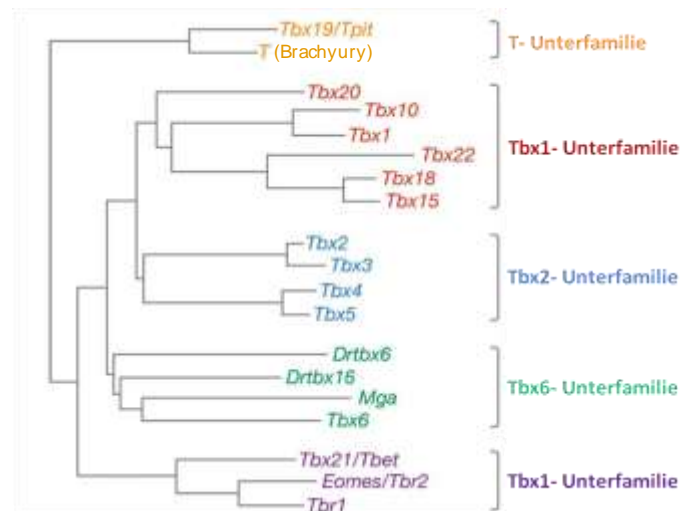


Bild I-6 Die T-Box-Genfamilie

Die phylogenetische Systematik zeigt die Genverwandschaft der fünf verschiedenen Tbx-Unterfamilien, wobei Tbx5 der Tbx2-Unterfamilie zuzuordnen ist (modifiziert nach [161]).

Das ursprüngliche und am frühesten entdeckte T-Box-Gen ist T- heute besser bekannt als Brachyury (aus dem Altgriechischen: βραχυς- kurz und ουρα- Schwanz)- benannt nach der „Loss-of-Function“-Mutation im Mäusebrachyurygen, welche im heterozygoten Zustand zu einer Kurzschwänzigkeit von Mäusen führt (im homozygoten Zustand letal) und bereits 1927 von Nadine Dobrovolskaia-Zavadskaia beschrieben wurde [162].

Das gemeinsame charakteristische Merkmal der T-Box-Genfamilie ist eine hoch konservierte, sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne- die sogenannte T-Box. Diese T-Box besteht aus 180 Aminosäuren, wird von allen Tbx-Genen exprimiert und kann bei den jeweiligen Zielgenen an eine sequenzspezifische „T-Site“ (T-Box bindendes Element) binden [161, 163]. Damit

wird- in Abhängigkeit vom zellulären Kontext- eine Aktivierung oder Repression des Zielgens gefördert und darüber hinaus eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren ermöglicht [159, 164-169] (s. Bild I-7).

		Percent identity with Tbx1			Cardiac downstream targets
		Amino-terminus	T-box	Carboxy-terminus	
Tbx1		100%	100%	100%	<i>Fgf10</i> (Activation)
Tbx18		14.7%	61.4%	11.7%	No known targets
Tbx20		9.3%	63.6%	13.6%	<i>Nppa</i> (Repression/Activation)
		Percent identity with Tbx2			
		Amino-terminus	T-box	Carboxy-terminus	
Tbx2		100%	100%	100%	<i>Nppa</i> , <i>Cx40</i> , <i>Cx43</i> (Repression)
Tbx3		53.7%	95.1%	34.8%	<i>Nppa</i> , <i>Cx40</i> (Repression)
Tbx5		15.4%	65.2%	10.1%	<i>Nppa</i> , <i>Cx40</i> (Activation)

Bild I-7 Beispiele von T-Box Transkriptionsfaktoren, welche für die kardiale Entwicklung von Bedeutung sind

Tbx5 besitzt eine stark aktivierende Domäne, während Tbx3 zusätzlich und Tbx2 ausschließlich repressorische Domänen besitzen. Allen Transkriptionsfaktoren ist die T-Box-Bindungsdomäne gemein. Die T-Box-Bindungsdomäne ist schwarz dargestellt; „A“ steht für eine stark aktivierende Domäne, „R“ für eine stark repressorische Domäne (Abbildung aus [163]).

Sieben Mitglieder der T-Box Genfamilie sind besonders entscheidend für die embryonale Herzentwicklung in Vertebraten- Tbx1-Tbx5, Tbx18 und Tbx20 (aus den T-Box-Genfamilien 1 und 2), welche überlappende Expressionsmuster in den Vorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes zeigen [161], gerne untereinander interagieren und oft hierarchische Strukturen aufweisen [159]. Ihre Störung kann beim Menschen genetische Syndrome mit kongenitalen kardialen Fehlbildungen oder Missbildungen des Skelettes zur Folge haben [170-174]. Eines der bisher am besten charakterisierten T-Box-Gene ist Tbx5.

1.5.2 Charakterisierung von Tbx5-Gen und Protein

Tbx5 ist ein hoch konserviertes Gen, welches unter anderem von Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugetieren exprimiert wird [175]. Tbx5 liegt auf dem Chromosom 12q24.1 beim Menschen und auf dem Chromosom 5 bei der Maus [176, 177]. Tbx5 kodiert ein aus 519 Aminosäuren bestehendes Protein, welches beim Menschen und der Maus zu 96% identisch ist, wobei sich die T-Box vom murinen und humanen Tbx5 in nur einer einzigen Aminosäure unterscheidet. Auch bei anderen untersuchten Spezies wie Huhn und Molch zeigt sich das Tbx5-Protein ähnlich hoch konserviert [178]. Tbx5 setzt sich dabei aus einem N-Terminus von ungefähr 56 Aminosäuren, gefolgt von der 180 Aminosäuren langen DNA-Bindungsdomäne (T-Box) und einem 282 Aminosäuren langen C-Terminus zusammen [171, 179] (s. Bild I-8).

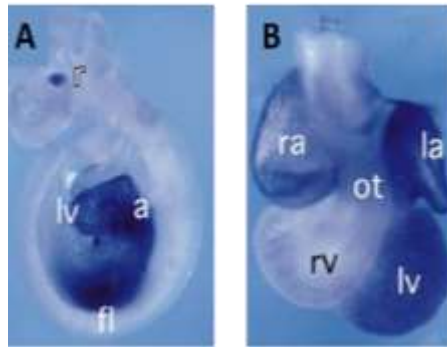


Bild I-9 Expressionslokalisation von Tbx5 am Beispiel der Maus während der Embryonalentwicklung mittels mRNA-in-Situ-Hybridisierung

(A) Am Tag E9.5 ist eine ausgeprägte Tbx5-Expression an der Retina (r), linken Ventrikel (lv), Vorhöfen (a) und vorderen Gliedmaßen (fl) vorhanden. (B) Entnommenes Mäuseherz am Tag E11.5: Tbx5 wird vor allem im linken Ventrikel und in den Vorhöfen exprimiert; eine Expression im rechten Ventrikel ist nicht erkennbar (ra: rechter Vorhof, la: linker Vorhof, ot: Ausflusstrakt, rv: rechter Ventrikel, lv: linker Ventrikel) (modifiziert nach [178]).

Mittels In-Situ-Hybridisierungen konnte in verschiedenen Spezies die kardiale Expression von Tbx5 während der Embryonalentwicklung zeitlich und räumlich genauer bestimmt werden und wird im folgenden Abschnitt am Beispiel der Maus erläutert [178].

1.5.4 Bedeutung von Tbx5 in der Kardiogenese

Im frühen Stadium des sich entwickelnden Mäuseherzens wird Tbx5 gleichmäßig im kardialen Herzbogen exprimiert (E8.0) [178] (s. Bild I-10, A). Sobald sich jedoch das lineare Herzrohr bildet (E8.25), wird Tbx5 in graduellen Abstufungen entlang des Herzrohres mit höchster Intensität am posterioren Ende (welches sich zum Sinus Venosus und den Vorhöfen entwickelt) und einer niedrigen bis nicht vorhandenen Intensität am anterioren Ende exprimiert [178] (s. Bild I-10, B). Während des „*Herzloopings*“ (E8.5-E9.0) breitet sich die Tbx5-Expression sehr rasch nach anterior aus und wird- neben einer Expression in den Vorhöfen, dem Vorhofseptum, der Vena Cava (inferior und superior) und den atrialen Anteilen der atrioventrikulären Herzklappen- ausschließlich in der linken Ventrikelkammer exprimiert [178] (s. Bild I-10, C).

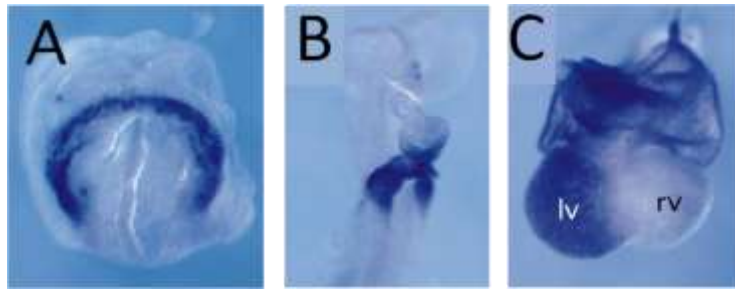


Bild I-10 Murine Expressionslokalisation von Tbx5 während der Embryonalentwicklung mittels mRNA-in-Situ-Hybridisierung

(A) Am Tag E8.0 wird Tbx5 gleichmäßig im kardialen Herzbogen exprimiert; (B) E8.25 graduelle Abstufung der Tbx5-Expression im Herzrohr mit höchster Intensität im posterioren Bereich; (C) Entnommenes Mäuseherz am Tag E11.5: Tbx5 wird vor allem im linken Ventrikel und in den Vorhöfen exprimiert; eine Expression im rechten Ventrikel ist nicht erkennbar (rv: rechter Ventrikel, lv: linker Ventrikel) (modifiziert nach [178]).

Dies führt zu einem steilen Expressionsgradienten zwischen den Tbx5-exprimierenden Zellen im zukünftigen linken Ventrikel und den Tbx5-negativen Zellen im rechten Ventrikel [175, 178, 186]. An dieser Grenzlinie formt sich das intraventrikuläre Septum (E9.5-E10), welches als antero-posteriore Grenzstruktur zwischen den Ventrikeln betrachtet werden kann [160, 178]. Ektope Expression von Tbx5 in dem sich entwickelnden Herzen führt zu einem interventrikulären Septumsdefekt und einem einzelnen Ventrikel von linksventrikulärem Charakter [178]. Stärker lokalisierte ektope Tbx5-Expression führt zu einer anterioren Verschiebung des interventrikulären Septums und einer Hochregulation von Transkriptionsfaktoren, welche normalerweise im linken Ventrikel stark angereichert sind [178].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tbx5 für eine linksventrikuläre Identität benötigt wird, da durch den Tbx5-Gradienten zwischen rechten und linken Ventrikel die Grenze der Kammern definiert wird. Dieser Tbx5-Gradient ist nach heutiger Forschungsmeinung für die intraventrikuläre Septumbildung essentiell [160, 175, 186].

Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass die kardiale Tbx5-Expression während der Embryonalentwicklung jedoch in den verschiedenen Spezies variiert. Während beispielsweise bei Amphibien Tbx5 bei nur einem Ventrikel im gesamten Herzen exprimiert wird [187], ist bei Vögeln und Säugetieren ein starker Tbx5-Expressionsgradient zwischen dem rechten und linken Ventrikel festzustellen [175]. Untersuchungen zeigen, dass die Tbx5-Expression der Maus der humanen Tbx5-Expression sehr ähnlich ist [179]. Darüber hinaus sind die murine und humane Herzentwicklung im evolutionären Sinne sehr verwandt [175], so dass sich von den hauptsächlich aus murinen Tierexperimenten stammenden Forschungsergebnissen viele Rückschlüsse auf die Expression und Funktion von Tbx5 am humanen Herzen ziehen lassen.

1.5.5 Mutationen von Tbx5

Die hohe Bedeutung von Tbx5 für die Embryonalentwicklung wurde in der Forschung erkannt, als Basson et al. und Li et al. 1997 Mutationen des humanen Tbx5-Gens als Ursache des Holt-Oram-Syndroms (HOS) nachweisen konnten [171, 179, 188].

Das Holt-Oram-Syndrom, benannt nach seinen Erstbeschreibern und Londoner Kardiologen Holt und Oram im Jahr 1960 [189], ist das häufigste Herz-Hand-Syndrom beim Menschen und durch bilaterale Defekte der oberen Gliedmaßen und des Herzens charakterisiert. Es wird autosomal-dominant vererbt und tritt relativ selten auf (1:100000). Alle Patienten mit HOS haben Missbildungen der oberen Gliedmaßen und in 75% der Fälle auch kardiale Missbildungen [188]. Obwohl das Holt-Oram-Syndrom eine komplette genetische Penetranz hat [190], variieren die klinischen Manifestationen sehr stark- sogar innerhalb betroffener Familien [191]. Sie reichen an den oberen Gliedmaßen von diskreten Handwurzelknochenmissbildungen bis hin zu stark verkürzten oder fehlenden Gliedmaßen und am Herzen von Reizleitungsstörungen wie beispielsweise AV-Blöcken bis hin zu kardialen Missbildungen wie Atriumseptumsdefekte vom Sekundumtyp, Ventrikelseptumsdefekte und der Fallotschen Tetralogie [171, 179]. Es sind weit über 30 verschiedene Mutationen auf dem Tbx5-Gen bekannt, die sich klinisch als HOS manifestieren; über 20 betreffen dabei Mutationen innerhalb der T-box-Bindungsdomäne [192]. Die Mutationen beeinträchtigen dabei die Fähigkeit des Tbx5-Proteins, Transkriptionen im Zielgen zu aktivieren, DNA zu binden oder mit anderen kardialen Transkriptionsfaktoren zu interagieren [163]; Mutationen, die innerhalb der T-Box-Bindungsdomäne liegen, gehen dabei mit klinisch besonders schweren Phänotypen einher [177].

In einem Knockout-Mausmodell von Bruneau et al. wurden die Folgen von einem homozygoten bzw. heterozygoten Tbx5-Knockout während der Embryonalentwicklung rekapituliert [164]. Homozygote Tbx5^{del/del} Mäuse verstarben dabei bereits am Embryonaltag 10.5, da Herzentwicklung zwar initiiert werden konnte, aber an E9.5 sistierte. Heterozygote Tbx5^{del/+} Mäuse zeigten eine perinatale Letalität von 40% und wiesen Missbildungen an den oberen Extremitäten, Herzdeformitäten (insbesondere ASD, VSD) und Störungen im Reizleitungssystem auf und rekapitulierte damit die phänotypischen Defekte von Patienten mit HOS [164]. Diese Untersuchungen unterstreichen die vielfältige und komplexe Wirkungsweise von Tbx5 in der Embryonalentwicklung, welche auch heute bisher nur zum Teil verstanden wird.

1.5.6 Zielgene von Tbx5 und seine Rolle innerhalb der T-Box-Familie

ANP und Connexin 40 (Cx40), welche während der Embryonalentwicklung kammerspezifisch sind, sind direkte Ziele von Tbx5 und werden gemeinsam von Tbx5 und Nkx2.5 reguliert [164, 167, 193]. Tbx5 und Gata4 aktivieren ebenfalls synergistisch den ANP-Promotor [186]. ANP

verfügt über insgesamt drei T-Box-bindende Elemente (TBE) in seiner proximalen Promotorsequenz [164, 167].

Während Tbx5 einen aktivierenden Einfluss auf Nppa (kodiert ANP) und Gja5 (kodiert Cx40) hat und damit indirekt die Kammerentwicklung fördert, wird durch Tbx2 die Kammerentwicklung inhibiert [159]. In-vitro-Experimente zeigen, dass die ANP- und Cx40-Expression durch Tbx2 inhibiert werden kann [159, 164, 167]. Tbx2 wird wiederum durch den Transkriptionsfaktor Tbx20 direkt gehemmt [159, 194]. Stennard und Harvey schlagen daher ein Modell vor, in dem Tbx2 durch eine kompetitive Bindung an TBE indirekt den aktivierenden Einfluss von Tbx5 verhindert und somit eine Kammerentwicklung inhibiert wird [159] (s. Bild I-11).

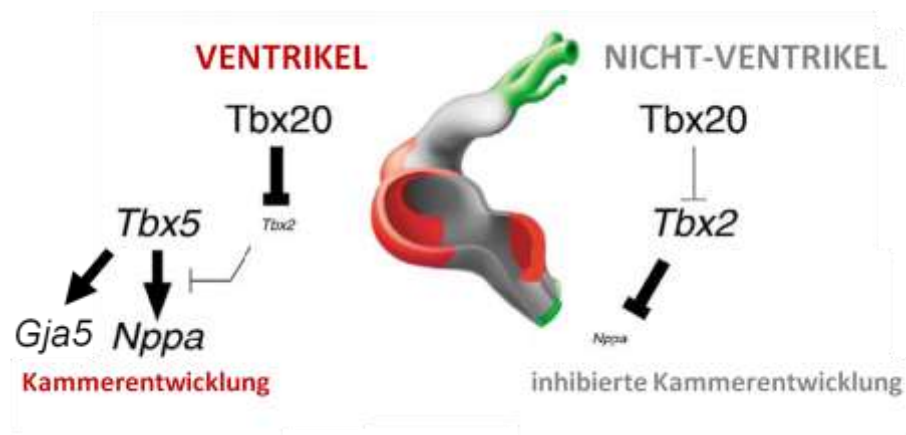


Bild I-11 Modell der Rolle der T-Box-Transkriptionsfaktoren an der kardialen Kammerentwicklung nach Stennard und Harvey [159]

Tbx5 nimmt mit direkter Aktivierung der Gene von Connexin 40 (Gja5) und ANP (Nppa) eine zentrale Rolle in der Kammerentwicklung ein. Tbx20 inhibiert Tbx2, welches seinerseits die Kammerentwicklung inhibiert. Bei Repression von Tbx2 durch Tbx20 kann Tbx5 seine Zielgene und die Kammerentwicklung aktivieren (modifiziert nach [159]).

Nach diesem Modell nimmt Tbx5 mit seiner aktivierenden Wirkung auf ANP und Cx40 eine Schlüsselrolle in der Kammerentwicklung ein. Ein weiteres Zielgen von Tbx5 scheint Srf (Serum Response Factor) zu sein [195]- ein Gen, das an der Expression von Herz- und Skelettmuskel sowie glatter Muskulatur beteiligt ist; außerdem scheint Tbx5 synergistisch mit Mef2c das Gen von Myh6 (Myosin Heavy Chain 6), welches essentiell für eine kardiale Muskelkontraktion ist, zu aktivieren [196].

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Tbx5 in Kombination mit den Transkriptionsfaktoren Mef2c und Gata4 kardiale oder dermale Fibroblasten direkt in funktionale Kardiomyozyten mit spontaner Kontraktion und der Expression kardialer Marker in vitro reprogrammieren kann. In der elektrophysiologischen Untersuchung dieser Zellen konnten dabei Aktionspotentiale mit starker Ähnlichkeit von adulten Kardiomyozyten gemessen werden [197]. Dies bestätigt die

herausragende Rolle von Tbx5 in der Kardiogenese und zeigt, dass ein molekulares Verständnis von Tbx5 auch für eine klinische Anwendung von großer Bedeutung ist.

1.6 Wege zur klinischen Anwendung von embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen mit ihren unbeschränkten proliferativen Eigenschaften und dem unbestreitbaren Potential, sich in Kardiomyozyten differenzieren zu können, wurden bereits 1996 von Klug et al. bezüglich ihrer kardialen Regeneration im Mausmodell evaluiert. Hierbei konnten genetisch selektierte, von murinen Stammzellen abstammende Kardiomyozyten stabile intrakardiale „*Grafts*“ im Herzen bilden [198].

Min et al. waren die ersten, die das Überleben von aus murinen ES-Zellen generierten Kardiomyozyten im infarzierten Herzen demonstrierten [199, 200]. Spätere Studien zeigten im Tiermodell, dass das Anwachsen von Herzmuskelzellen, welche von murinen ES-Zellen abstammten, zu einer Verbesserung der globalen Pumpfunktion, Abschwächung des Remodeling-Prozesses und Verstärkung der Neovaskularisation am Herzen führt [201-204]. Eine dieser erwähnten Studien konnte die funktionalen Verbesserungen interessanterweise nur für Kardiomyozyten zeigen, welche aus murinen ES-Zellen gewonnen worden waren; die im direkten Vergleich durchgeführte Transplantationsstudie mit Knochenmarksstammzellen erbrachte hingegen keinen Vorteil [204].

Neuere in-vivo Transplantationsstudien zeigen, dass die Transplantation mit von humanen ES-Zellen abstammenden Kardiomyozyten in das infarzierte Herz von immundefizienten Mäusen, Ratten und Schweinen zu der Bildung von funktionellen „*Grafts*“ aus humanem Herzmuskelgewebe führt [150, 205-211]. Die Zelltransplantate in den erwähnten Studien exprimierten dabei etliche kardiale Marker, entwickelten Sarkomerstrukturen bei einer Reifung und Vaskularisation im Zeitverlauf und konnten darüber hinaus bis zu einem gewissen Ausmaß noch weiter proliferieren [150, 205-208]. In einer Studie wurde dabei beobachtet, dass beim Gebrauch von relativ ungereinigten Zellpräparationen ein präferiertes Überleben von Kardiomyozyten im Vergleich zu den Nicht-Kardiomyozyten stattfand [208]. Verschiedene Studien zeigten, dass Spenderkardiomyozyten generell mit dem Empfängergerewebe elektrisch koppeln können- sowohl bei in-vitro-Cokulturen [206] als auch bei in-vivo-Transplantationsstudien mit fetalen Kardiomyozyten [212, 213].

Untersuchungen von Kehat et al. und Xue et al. demonstrierten, dass transplantierte Kardiomyozyten unter bestimmten Bedingungen sogar eine Schrittmacherfunktion übernehmen und die elektrophysiologische Aktivität des Herzens steuern können [206, 211].

Zusammenfassend lassen sich aus den Tierstudien trotz Unterschieden im experimentellen Design (z. B. untersuchte Spezies, Methode und Zeitpunkt der Infarktauslösung und Unterschiede in der Zellkultur) einige vorläufige Schlüsse ziehen. Zum einen sind die Kardiomyozyten nach der Transplantation in der Lage, sich in das Empfängermyokard zu integrieren und zu überleben. Zum anderen werden in den Studien positive Effekte auf das Überleben der Tiere, die

linksventrikuläre Funktion und das Remodeling gezeigt, was die Vermutung zulässt, dass die implantierten Herzmuskelzellen mit den Empfängermyozyten über „*Gap-Junctions*“ eine elektrophysiologische Koppelung bilden und damit die Herzkontraktion ermöglichen.

Obwohl die Ansätze kardialer Zelltherapie nach dem heutigen Stand der Forschung sehr vielversprechend sind, existieren jedoch gerade in Hinblick auf die Anwendung am Menschen wesentliche Hürden bezüglich Sicherheit, technischer Umsetzung und immunologischer Schwierigkeiten, welche aktuell eine klinische Anwendung von embryonalen Stammzellen unmöglich machen und daher vor einem erfolgreichen klinischen Einsatz dringend zu lösen sind. Sie sollen in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

1.6.1 Immunologische Problematik embryonaler Stammzellen und Alternativen

Embryonale Stammzellen sind für ein potentielltes Empfängerewebe grundsätzlich heterologdemzufolge ist bei einer kardialen Stammzelltransplantation mit einer direkten immunologischen Reaktion gegen das transplantierte Fremdewebe zu rechnen.

Die Charakterisierung von humanen ES-Zellen zeigte, dass humane ES-Zellen HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, jedoch keine HLA-Klasse-II-Moleküle [214] und dass daher transplantierte hESC im Empfängerorgansimus offensichtlich eine geringere Immunantwort hervorrufen als eine herkömmliche Organtransplantation [215]. Somit könnte unter Umständen das immunsuppressive Regime nach Transplantation embryonaler Stammzellen im Vergleich zur herkömmlichen Immunsuppression reduziert werden [216]. Trotzdem ist zu erwarten, dass kardiale Zellen, welche von hES-Zellen abstammen, nach einer Transplantation in ein immunkompetentes Herz abgestoßen werden [217]. In den letzten Jahren wurden daher etliche Strategien und Überlegungen entwickelt, um das Problem der Immunogenität zu lösen oder zumindest zu reduzieren. Diese sollen im Folgenden skizziert werden.

„Klassische“ Strategien bemühen sich darum, die Allo-Antigen-Differenz zwischen Spender und Empfänger zu reduzieren, was beispielsweise durch die Einrichtung von „Banken“ von MHC-Antigen-typisierten-hES-Zellen erfolgen könnte. Hierbei könnten vor einer anstehenden Gewebe- und Organtransplantation die Gewebeeigenschaften von Spender und Empfänger als Routineuntersuchung abgeglichen werden [216, 218]. Eine alternative Lösung wäre das Generieren einer universellen Spender-hESC-Linie. Dies könnte durch das Stilllegen von Genen erreicht werden, welche ein Bestandteil des MHCs sind oder durch das Einfügen oder Löschen anderer Gene, welche die Immunreaktion modulieren [216, 219].

Die dennoch sicherlich zu favorisierende Lösung wäre die Generierung patientenspezifischer, pluripotenter Zellen und die anschließende Differenzierung in den gewünschten Zelltypen [22, 216].

Zur Herstellung maßgeschneiderter, patientenspezifischer isogener Stammzellen, welche sich zu kardialen Zellen differenzieren ließen, gibt es verschiedene Ansätze. Als wichtige Beispiele seien das Verfahren des therapeutischen Klonens, die Fusion von somatischen Zellen mit ES-Zellen, Zellexplantation aus den Hoden zur Herstellung spermatogonischer Stammzellen, die sogenannte „Jungfernzeugung“ (Parthenogenese) und die bereits in 1.3.4. dargestellte Reprogrammierung von humanen Zellen zu sogenannten iPS-Zellen genannt (s. Bild I-12).

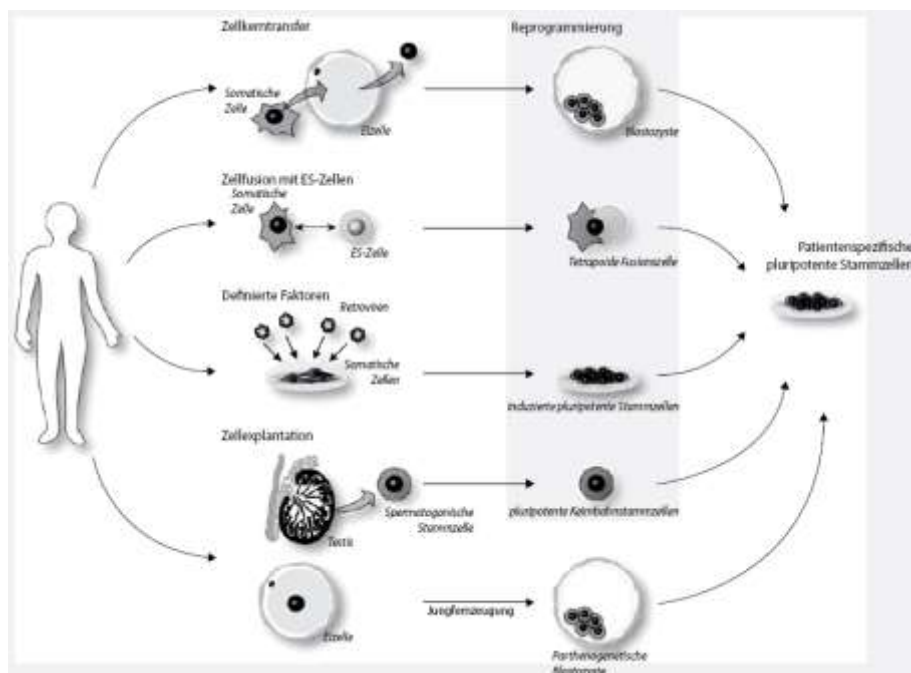


Bild I-12 Ansätze zur Generierung patientenspezifischer ES-Zellen

Mit Hilfe von patienteneigenen Körperzellen können durch verschiedene Verfahren (therapeutisches Klonen, Fusion somatischer Zellen mit ES-Zellen, Reprogrammierung somatischer Zellen, Zellexplantation spermatogonischer Zellen oder Jungfernzeugung) patientenspezifische, pluripotente Stammzellen generiert werden, die sich zu autologen, kardialen Zellen differenzieren lassen (modifiziert nach [22]).

Beim „therapeutischen Klonen“ (Somatic Nuclear Transfer Technology (SCNT))- auch bekannt als „*Genomic Replacement*“– wird aus einer unbefruchteten Eizelle der Zellkern entfernt und stattdessen der Kern einer somatischen Zelle eingeführt. Die rekonstruierte Eizelle wird anschließend mittels spezieller Chemikalien zur Teilung angeregt und vollzieht im Idealfall in der Zellkultur die gleiche Entwicklung wie eine natürlich befruchtete Eizelle [22]. Sobald sich eine Blastozyste gebildet hat, können Zellen der inneren Zellmasse verwendet werden, um pluripotente Zellen zu produzieren, welche genetisch identisch sind mit dem Zellkern der Spenderzellen- mit Ausnahme der mitochondrialen DNA [220]. Mit diesem Verfahren konnten kürzlich ES-

Zellen beim Rhesusaffen [221] und beim Menschen [222] generiert werden und sind dabei scheinbar nicht von herkömmlichen embryonalen Stammzellen zu unterscheiden [223]. Dennoch ist ihre Erzeugung technisch sehr schwierig, ineffizient und darüber hinaus ethisch äußerst umstritten- in Deutschland ist zum aktuellen Zeitpunkt therapeutisches Klonen verboten.

Bei einer Reprogrammierung durch Zellfusion mit ES-Zellen wird nach Vermischung beider Zelltypen auf chemischem oder elektrischem Wege eine Fusion induziert. Fusionierte Zellen zeigen die Morphologie von ES-Zellen, besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ein hohes Differenzierungspotential in vivo, sind aber in einem weitaus geringeren Maße an der Ausbildung von Gewebe und Organen beteiligt als normale ES-Zellen [224], was an der Tetraploidie (d.h. sie enthalten statt dem normalen diploiden Chromosomensatz die doppelte Anzahl an Chromosomen) der fusionierten Zellen liegt. Diese Tetraploidie ist das Haupthindernis für ihre mögliche medizinische Anwendung; erste Ansätze, einzelne Chromosomen aus den Zellen zu entfernen, sind zum jetzigen Zeitpunkt noch ungenügend [225].

Ein weiteres Verfahren zur Generierung pluripotenter und potentiell patientenspezifischer Zellen ist die Explantation von Keimbahnzellen. Hierbei kommt beim männlichen Individuum die Explantation spermatogonialer Zellen aus dem Hoden in Frage [226, 227]; analog dazu können bei der sogenannten Jungfernzeugung aus den weiblichen Eizellen unbefruchtete Oozyten mittels spezieller Chemikalien zur Teilung angeregt werden; aus den dabei entstehenden Blastozysten können anschließend ES-Zellen gewonnen werden [228-231]. Beide Verfahren der Zellexplantation haben gemeinsam, dass sie zwar ethisch weitgehend unbedenklich, aber technisch sehr aufwendig und schwierig sind.

Wie bedeutsam die Generierung patientenspezifischer Zellen für das Fortkommen der medizinischen Entwicklung angesehen wird, zeigte die Nobelpreisvergabe vom Oktober 2012: der Nobelpreis für Medizin ging gemeinsam an die Stammzellpioniere John Gurdon (Großbritannien) und Shinya Yamanaka (Japan). Die beiden Forscher wurden für die Entdeckung geehrt, dass reife Zellen des ausgewachsenen Körpers in unreife Stammzellen rückverwandelt werden können.

Gurdon wurde für Forschungsarbeiten ausgezeichnet, die er schon Anfang der 1960er Jahre ausgeführt hatte: er wendete als erster Forscher das „therapeutische Klonen“ an, indem er bei einer Eizelle einer Kaulquappe den DNA-haltigen Zellkern gegen den Kern einer reifen Körperzelle aus dem Darm einer Kaulquappe austauschte. Aus dieser modifizierten Eizelle konnte eine Kaulquappe geklont werden [232]. Später übertrug er diese Experimente auch auf Frösche. Diese grundlegenden Erkenntnisse führten zur bahnbrechenden Entdeckung der iPS-Zellen durch Yamanaka im Jahr 2006.

Trotz aller Auszeichnungen bleibt die langfristige Bedeutung von iPS-Zellen im Sinne einer direkten Anwendung am Menschen aufgrund der in 1.3.4 erwähnten Limitationen- wie potentielle Mutagenität und Ineffizienz im Generierungsprozess- jedoch nach wie vor offen.

1.6.2 Zellüberleben und benötigte Zellmengen

Eine weitere Herausforderung der kardialen Stammzelltransplantation ist die Tatsache, dass der Großteil der transplantierten Zellen nach der Transplantation längerfristig nicht überlebt. Es wird geschätzt, dass fast neun von zehn Zellen, welche sich zunächst im Herzen ansiedeln können, zugrunde gehen [10, 233]. Zwischenzeitlich wurden einige Methoden entwickelt, um das Zellüberleben zu erhöhen- beispielsweise Hitzeschockbehandlungen der Zellen vor der Transplantation [208], forcierte Expression antiapoptotischer Proteine [234] oder Transplantationen mit Anwendung eines Cocktails aus bestimmten Überlebensfaktoren [235]. Dennoch ist unbestreitbar, dass für eine erfolgreiche Transplantation beim Menschen bereits vor der eigentlichen Transplantation eine große Menge vom gewünschten Zelltyp zur Verfügung stehen muss, um trotz des großen Zellverlustes bei der Transplantation eine ausreichend große Zellanzahl gewährleisten zu können.

1.6.3 Teratombildung durch embryonale Stammzellen

Teratome sind Tumoren, welche von Zellderivaten aller drei Keimblätter abstammen und ein gutartiges, nur verdrängendes, jedoch ausgeprägtes Wachstumsverhalten zeigen [236]. Etliche Arbeitsgruppen demonstrierten, dass undifferenzierte ES-Zellen in der Lage sind, Teratome zu bilden, wenn sie in syngene oder allogene Empfängerherzen transplantiert werden [99, 217] (s. Bild I-13) und sich vor allem durch ihre Masse nachteilig auf die kardiale Funktion auswirken.

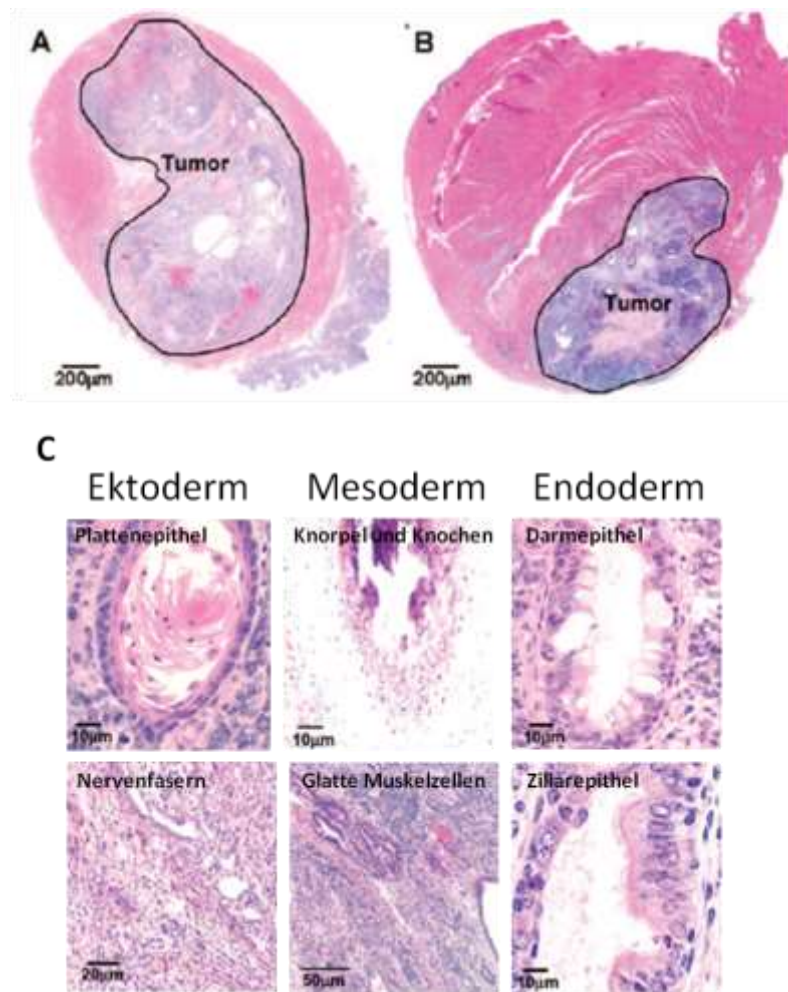


Bild I-13 Teratombildung in Mäuseherzen nach Zellinjektionen von undifferenzierten embryonalen Stammzellen in histologischen Schnitten und HE-Färbung

A: Teratombildung bei immunsupprimierter Maus

B: Teratombildung bei immunkompetenter Maus

C: Ausschnitte aus den Teratomen zeigen Derivate von Ektoderm (Plattenepithel und Nervenfasern), Mesoderm (Knorpel und Knochen, glatte Muskelzellen) und Endoderm (Darmepithel, Ziliarepithel) (modifiziert nach ([217])).

Unter bestimmten Bedingungen können bereits zwei einzelne ES-Zellen ausreichen, um Teratome zu bilden [237]. Die Transplantation von undifferenzierten hESCs in Ratten führt- in analoger Weise zu murinen ESCs- ebenfalls zur Bildung von Teratomen [205]. Dieser Prozess zeigt, dass adultes Herzgewebe alleine nicht die notwendigen Signale für eine Kardiomyozytenreifung bereitstellt, sondern die zu transplantierenden Zellen bereits vor der Transplantation eine fortgeschrittene Ausreifung hinsichtlich ihres kardialen Zelltyps benötigen, um der Gefahr einer möglichen Teratombildung vorzubeugen.

1.6.4 Elektromechanische Integration von ES-Zellen und die Gefahr von Arrhythmien

Eine weitere Voraussetzung für eine mögliche klinische Anwendung von kardialen ES-Zellen ist die Vermeidung von arrhythmogenem Potential. Zwar deuten tierexperimentelle Vorversu-

che darauf hin, dass eine elektromechanische Koppelung stattfinden kann (s. 1.6); es lässt sich aber zum aktuellen Zeitpunkt schlecht abschätzen, ob transplantierte Zellen sich beim Menschen tatsächlich elektromechanisch in das Empfängergewebe integrieren können. Bei einer mangelnden elektromechanischen Koppelung könnten arrhythmogene Zentren im Herzen begünstigt werden. Auch unter der Voraussetzung einer mechanischen Koppelung könnten durch elektrophysiologische Unterschiede, wie beispielsweise einer höheren Schlagfrequenz der transplantierten Zellen, rhythmogene Komplikationen auftreten [11]. Somit ist es für eine zukünftige klinische Anwendung von außerordentlicher Wichtigkeit, für Transplantationen nicht nur eine möglichst reine Kardiomyozytenpopulation, sondern auch einen möglichst homogenen Kardiomyozyten-subtyp vorliegen zu haben- wie beispielsweise einen ventrikulären Zelltyp.

1.7 Herstellung reiner Kardiomyozytenpopulationen zur Transplantation

Eine in-vitro Differenzierung von pluripotenten embryonalen Stammzellen führt zu einem Gemisch vieler verschiedener Zelltypen. So liegt der Kardiomyozyten-Anteil– je nach Literaturangabe– zwischen 1-10% an der gesamten ES-Zell-Kultur [11, 198]. Dabei setzt sich die Population der Herzmuskelzellen zusätzlich aus diversen Subpopulationen zusammen, die nach elektrophysiologischen Gesichtspunkten den Herzmuskelzellen der Vorhöfe, den beiden Ventrikeln und dem Reizleitungssystem zugeordnet werden können, so dass nur ein kleiner Teil der gesamten Zellpopulation einem bestimmten kardialen Zelltyp entspricht [152]. Wenn man bedenkt, dass ein typischer Myokardinfarkt zu einem durchschnittlichen Verlust von ca. 50 g Herzmuskel führt [238], wären pro Transplantation ca. 10^8 bis 2×10^9 Zellen nötig [239, 240]– dies entspricht in etwa 100 klassischen 10 cm-Zellkulturschalen–, so dass für eine erfolgreiche klinische Anwendung eine ausgesprochen hohe Ausbeute an Kardiomyozyten benötigt wird, welche mit einer „normalen“ ES-Zell-Kultur schwer befriedigt werden kann, auch wenn mit Hilfe von Bioreaktoren versucht wird, zukünftig eine gezielte hohe Zellausbeute zu ermöglichen [241, 242].

Des Weiteren birgt eine heterogene ES-Zellkultur zusätzlich klinisch entscheidende Gefahren wie die in 1.6.3 und 1.6.4 erwähnten möglichen Probleme der Teratombildung und Arrhythmien. So war in den letzten Jahren ein wesentliches Ziel der Stammzellforschung, geeignete Verfahren zu etablieren, um aus einer Stammzellkultur eine möglichst reine Kardiomyozytenpopulation hervorzubringen. Dabei lassen sich grob zwei Ansätze einteilen: eine initiale Anreicherung der Kardiomyozytenpopulation aus den sich differenzierenden embryonalen Stammzellen und eine gezielte Aufreinigung von Herzmuskelzellen aus einer heterogenen ES-Zellkultur.

1.7.1 Initiale Anreicherung der Kardiomyozytenpopulation

Es wurden in der Vergangenheit verschiedenste Methoden etabliert, um eine verstärkte Kardiogenese in der ES-Zellkultur zu induzieren. Diese umfassten sowohl die Zuführung von Wachstumsfaktoren wie TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1) [201], BMP (Bone morphogenetic protein) [201, 243], FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) [243] und Stickoxid (NO) [244], als auch Faktoren wie beispielsweise Retinsäure [245], Ascorbinsäure [246] und 5-Azacytidin [247], welche zu einer verstärkten Kardiogenese führen. Dabei war der Effekt– insbesondere bei den exogenen Faktoren– jedoch häufig konzentrations– zeitpunkts– und systemabhängig [245]. So gelang beispielsweise die Kardiogenese mit Retinsäure nur mit murinen und nicht mit humanen ES-Zellen [146], was ein Beispiel für die teilweise sehr eingeschränkte Übertragbarkeit dieser Methoden darstellt. Ein weiterer Ansatz war das sogenannte „*forward programming*“, bei dem durch Überexpression wichtiger früher kardialer Transkriptionsfaktoren– beispielsweise Nkx2.5– in embryonalen Stammzellen eine verstärkte Kardiogenese spezifischer

kardialer Subtypen forciert werden kann [248]. Obwohl mit verschiedensten Forschungsansätzen der Kardiomyozytenanteil aus der Stammzellkultur auf bis zu 70% erhöht werden konnte [9], war es bisher nicht möglich, eine reine Kardiomyozytenkultur zu erzeugen.

Aus diesem Grund konzentrieren sich viele Arbeiten im Bereich der Stammzellforschung darauf, kardiale Vorläuferzellen aus sich differenzierenden ES-Zellen zu identifizieren und zu isolieren, um damit optimalerweise eine reine Kardiomyozytenkultur zu etablieren.

1.7.2 Aufreinigung kardialer Vorläuferzellen

Um für die Transplantation reine Kardiomyozytenpopulationen zu gewinnen, waren erste Ansatzpunkte die enzymatische [146] oder mechanische [145, 205] Dissektion spontan schlagender Areale innerhalb der EBs. Diese Technik ist jedoch sehr arbeitsintensiv, für die Produktion großer Zellmengen ungeeignet und konnte darüber hinaus nur Kardiomyozytenpopulationen mit einer Reinheit von 50-80% erzielen- kardiale Subtypen ließen sich dabei jedoch nicht generieren [205, 216]. Andere Ansätze beruhten darauf, Kardiomyozyten mit Hilfe ihrer physikalischen Eigenschaften zu trennen. Dafür wurden diskontinuierliche Percoll-Gradienten verwendet, um die Kardiomyozyten mit ihrer vergleichsweise höheren Dichte als die der meisten anderen Zellen in der Zellkultur aus dem Sediment des Gradienten zu isolieren [146, 216]. Der jedoch bisher am erfolgreichsten durchgeführte Ansatz der Aufreinigung beruht auf einer genetischen Selektion kardialer Vorläuferzellen.

Da für die Selektion von Kardiomyozyten bzw. deren Subtypen kein geeigneter hochspezifischer, endogen exprimierter Oberflächenmarker zur Verfügung steht [19, 237, 249], wurde in verschiedensten Forschungsansätzen versucht, embryonale Stammzellen im undifferenzierten Zustand genetisch so zu modifizieren, dass kardiale Vorläuferzellen aufgrund einer bestimmten Markierung erkannt und selektiert werden können.

Klug et al. leisteten Pionierarbeit bezüglich dieser Strategie, indem sie als erste Arbeitsgruppe pluripotente murine ES-Zellen mit einem Konstrukt transfizierten, das aus dem kardialspezifischen „ *α -myosin-heavy-chain*“-(α MHC)-Promotor und der cDNA für Aminoglykosid-Phosphotransferase bestand, welche zur Neomycin- bzw. G418-Resistenz führte. Unter kardialer Differenzierung hatten die α -MHC-positiven Zellen eine Antibiotikaresistenz und konnten damit mit der Zugabe von Neomycin selektiert werden, wodurch eine Kardiomyozytenreinheit von über 99,6% erzielt werden konnte [198]. Andere Arbeitsgruppen entwickelten sowohl für murine [250] als auch für humane embryonale Stammzellen [207, 251] eine Selektionsstrategie, bei welcher die Expression eines grün-fluoreszierenden Proteins (EGFP) unter der Kontrolle eines kardial-spezifischen Promotors steht. So gelang es beispielsweise Müller et al., ein Konstrukt zu generieren, das einen CMV-Enhancer und den ventrikel-spezifischen MLC-2v-

Promotor kodiert, unter dessen Regulation EGFP exprimiert wird. Nach Differenzierung der embryonalen Stammzellen und Einzelzellpräparationen wurden die MLC-2v-positiven, grün-fluoreszierenden Kardiomyozyten mit einem durch Fluoreszenz aktivierten Zellsorter (FACS) aufgereinigt. Dadurch konnte eine Kardiomyozytenreinheit von 97% hervorgebracht werden [250] (s. Bild I-14).

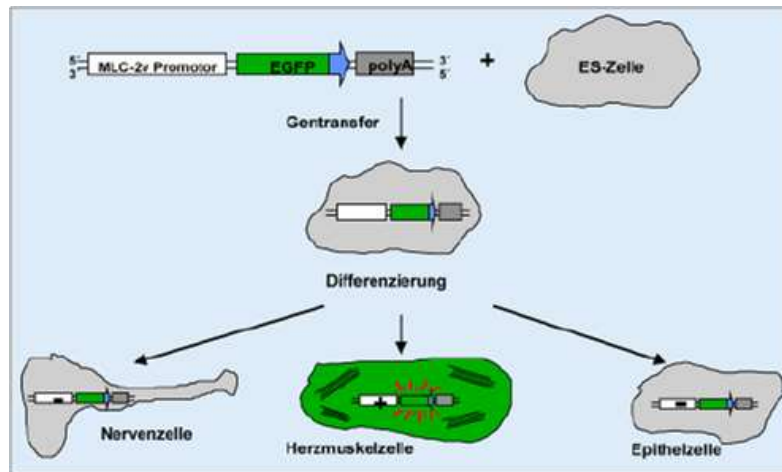


Bild I-14 Selektion ventrikulärer Kardiomyozyten aus in-vitro-differenzierten, grün-fluoreszierenden ES-Zellen mit Hilfe des kardial-spezifischen MLC-2v-Promotors

(modifiziert nach [252])

Huber et al. benutzen hingegen lentivirale Vektoren, um transgene humane ES-Zellen zu generieren, welche unter der Kontrolle des humanen MLC-2v-Promotors ein EGFP-Reportergen exprimierten, wodurch Kardiomyozytenreinheiten von über 93% erzielt werden konnten [207].

Diese beschriebenen Methoden bieten jedoch trotz ihrer hoch erzielten Reinheiten gravierende Nachteile, die die klinische Anwendbarkeit dieser Strategien stark in Frage stellen. Eine kardiale Aufreinigung, welche auf einer Antibiotikaselektion beruht, kann möglicherweise den kardialen Differenzierungsprozess stören und bei Antibiotikaresistenzen zur Selektion falsch positiver Klone führen [198, 253]. Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ist mit einer Sortierleistung von etwa 3000 Zellen/s für eine Reinheit von mindestens 95% hingegen viel zu langsam, um kardiale Vorläuferzellen in klinischer relevanter Quantität zu liefern [252], wenn man sich vor Augen hält, dass nach einem Myokardinfarkt für eine Transplantation mindestens 10^8 Zellen benötigt werden würden. Dies würde bei der genannten Sortierleistung eine klinisch kaum realisierbare Zeit von über 500 h beanspruchen [254]. Des Weiteren ist die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ein sehr zellschädigendes Verfahren, welches möglicherweise die elektrophysiologischen Eigenschaften von Kardiomyozyten verändert [254]. Außerdem gilt für diese Aufreinigungsmethode und für die Antibiotikaselektion die Problematik der Immunogenität eines transgen exprimierten, nicht humanen Proteins, welches zu immunologischen oder toxischen Reaktionen in Patienten führen könnte [254, 255].

Um diese genannten Probleme zu beseitigen, wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Methode etabliert, die auf dem Prinzip magnetischer Zellsortierung beruht und den Goldstandard für sanfte und zeitschonende Zellaufreinigung darstellt [254]. Das dabei von David et al. entwickelte Protokoll basiert auf der Transfektion von undifferenzierten ES-Zellen mit einem humanen Δ CD4-Oberflächenprotein, welches nicht endogen in der Stammzellkultur exprimiert wird. CD4 ist ein Oberflächenmolekül, welches normalerweise auf T-Helferzellen, Monozyten und dendritischen Zellen zu finden ist und eine wesentliche Bedeutung für die Immunabwehr einnimmt. Bei dem hier verwendeten Δ CD4 wurde die intrazelluläre Domäne hingegen deletiert, so dass keine Signaltransduktion ins Innere der Zelle möglich ist und Δ CD4 nur als Oberflächenmarker der transfizierten Zellen dient [256] (s. Bild I-15). Als humanes Protein ist außerdem eine immunogene Wirkung im Hinblick auf zukünftige klinische Anwendungen unwahrscheinlich.

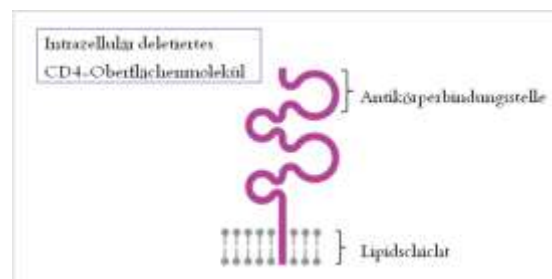


Bild I-15 Intrazellulär deletiertes CD4-Protein (Δ CD4)

Durch die trunkierte Variante des CD4-Oberflächenmoleküls ist keine Signaltransduktion ins Innere der Zelle möglich (modifiziert nach [257]).

ES-Zellen, die so transfiziert werden und das Δ CD4-Oberflächenprotein exprimieren, können mit CD4-Antikörpern markiert werden. Ein Eisenoxid-gekoppelter Zweitantikörper sorgt dafür, dass die Antikörper-beladenen Zielzellen in einer Säulenmatrix in einem Magnetfeld gebunden werden, während die nicht markierten Zellen die Säule passieren (Negativfraktion). Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld können die Zielzellen aus der Säule ausgewaschen (Positivfraktion) und gegebenenfalls wiederausplattiert werden (s. Bild I-16).

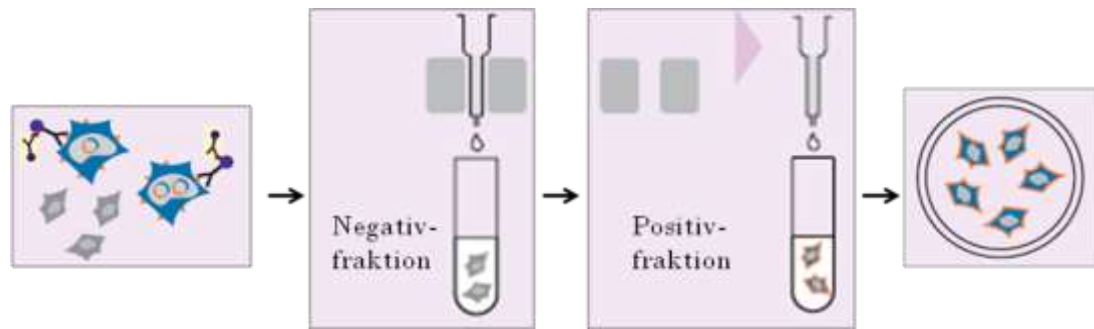


Bild I-16 Prinzip der MACS-Aufreinigung

Mittels eines spezifischen, Fluoreszenz-konjugierten Erstantikörpers gegen ein Oberflächenprotein werden die Zielzellen markiert. Ein Eisenoxid-gekoppelter Zweitantikörper sorgt dafür, dass die Antikörper-beladenen Zielzellen in der Säulenmatrix in dem Magnetfeld gebunden werden, während die restlichen Zellen die Säule passieren (Negativ-fraktion). Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld können die Zielzellen ausgewaschen werden (modifiziert nach [257]).

Mit diesem Protokoll konnte eine Anreicherung großer Zellzahlen mit Reinheiten von über 98% und die Identifikation von Populationen auch im Fall einer sehr geringen Ausgangspopulation (0,6%) erzielt werden [254]. Diese Methode ist neben der zellschonenden Zellseparation außerdem ein sehr effizientes Verfahren, da mittels magnetischer Zellsortierung bis zu 10^{11} Zellen pro Stunde isoliert werden können [254], was auch hinsichtlich einer klinischen Anwendung ein realistisches Zeitfenster für ein benötigtes hohes Zellaufkommen bietet.

1.8 Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Auf der Suche nach therapeutischen Möglichkeiten einer kardialen Regeneration sind embryonale Stammzellen mit ihrem nachgewiesenen kardialen Differenzierungspotential, ihrer Immortalität und den starken proliferativen Eigenschaften eine wesentliche Hoffnungsquelle für zukünftige Zelltherapien. Insbesondere bietet sich dabei eine große Chance, eine kausale Therapie für eine kardiale Regeneration zu ermöglichen.

Eines der Hauptprobleme embryonaler Stammzellen stellt jedoch der geringe Anteil an Kardiomyozyten unter spontaner Zelldifferenzierung dar; darüber hinaus führen die für die Zellgewinnung zunächst positiven proliferativen Eigenschaften undifferenzierter embryonaler Stammzellen zu nicht unerheblichen Risiken in der klinischen Anwendung: eine Transplantation zu undifferenzierter oder zu heterogener Zellen könnte zu Teratomen oder ausgeprägten Arrhythmien führen.

Ziel dieser Arbeit war daher, mit einer standardisierten und reproduzierbaren Methode eine möglichst reine und homogene Population an kardialen Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen zu gewinnen. Diese Zellen sollten dabei weit genug entwickelt sein, dass sie keine teratogenen Eigenschaften mit sich bringen würden, aber dennoch so früh in der kardialen Entwicklung stehen, dass es ihnen möglich sein würde, sich nach der Selektion zu vermehren und ein funktionelles Synzytium auszubilden. Für dieses Unterfangen wurde der in 1.7.2 beschriebene Ansatz der MACS-Aufreinigung von David et al. angewandt und auf den kardialen Transkriptionsfaktor Tbx5 übertragen. Hierfür sollte der Promotor des gut charakterisierten kardialen Transkriptionsfaktors Tbx5 verwendet werden, welcher in kardialen Vorläuferzellen exprimiert wird und einen Schlüsselfaktor für die Kardiogenese- insbesondere der Ventrikelbildung und linksventrikulärer Zellen- darstellt. Ein deletiertes CD4-Oberflächenmolekül sollte hierbei unter der Kontrolle des kardialen Promotors Tbx5 stehen, so dass bei einer kardialen Entwicklung der Zelle und der endogenen Verwendung des endogenen Tbx5-Gens im Idealfall gleichzeitig auch der exogen zugeführte Tbx5-Promotor aktiviert werden würde. Dadurch würde auf der sich kardial differenzierenden Zelle ein CD-Oberflächenmolekül exprimiert werden (s. Bild I-17).

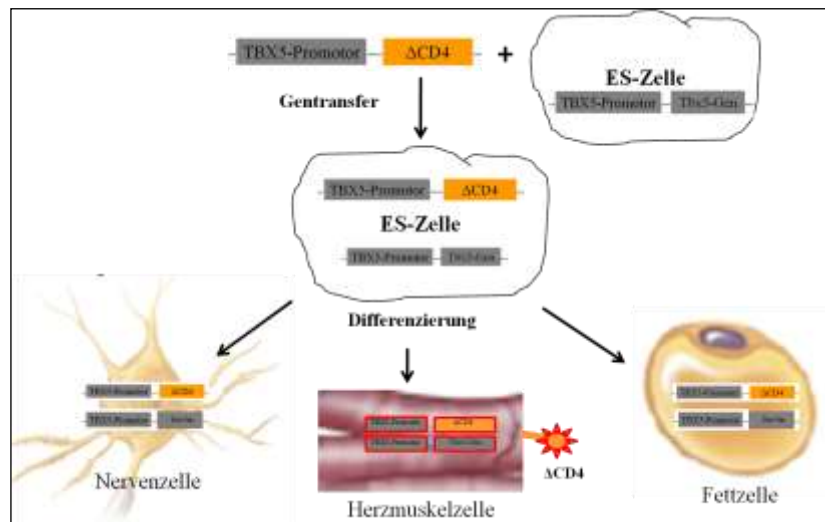


Bild I-17 Prinzip der spezifischen kardialen Identifizierung mittels TBX5-ΔCD4-Promotor

Undifferenzierte embryonale Stammzellen werden mit einem TBX5-ΔCD4-Promotorkonstrukt transfiziert; bei einer kardialen Differenzierung und Verwendung des (endogenen) Tbx5-Promotors wird gleichzeitig der exogen zugeführte Tbx5-Promotor verwendet und ein ΔCD4-Oberflächenprotein exprimiert, welches zur Identifizierung kardialer Zellen dienen kann (Abbildung modifiziert nach [252, 258]).

Mittels dieses Oberflächenproteins sollten die kardialen Vorläuferzellen gezielt aufgereinigt werden können, um einen spezifischen kardialen Zelltyp für eine Transplantation zu gewinnen. Die Arbeit sollte zum einen die Praktikabilität des Verfahrens überprüfen als auch die Funktionalität und Spezifität des Konstruktes bestätigen.

Somit soll der erste Teil der Arbeit zeigen, dass mittels des verwendeten Vektorkonstruktes eine hohe Aufreinigung grundsätzlich möglich ist. Der zweite Teil der Arbeit diene der Charakterisierung der aufgereinigten Zellen, um die Spezifität des Konstruktes und unveränderten charakteristischen Merkmale der Zellen nach dem Aufreinigungsprozesses zu bestätigen, um somit eine ideale Zellquelle und ein optimales Aufreinigungsverfahren für Transplantationen und „*Tissue Engineering*“ etabliert zu haben.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid, Bisacrylamid	Serva
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bradfordlösung	Biorad
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	VWR
Compelte Proteininhibitortabletten	Roche
DTT	Sigma
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Kanamycin	Gibco
LiCl	Sigma
Magermilchpulver	Heirler
Methanol	Roth
NaCl	Roth
NaF	Neolab Migge
Phenol	Roth
PMSF	Roche
Ponceau S	Serva
Propidiumjodid (PI)	Sigma
SDS	Roth
TEMED	Sigma
Tris base	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Biorad
Vandate	VWR

Allgemeine Laborchemikalien und Lösungsmittel in p.a. Qualität.

2.1.2 Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase (CIP)	Biolabs
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biolabs
Herculase-DNA-Polymerase	Stratagene
Lysozym	Sigma
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Merck
Protein-Molekulargewichtsstandard	BioRad
Restriktionsendonukleasen	Biolabs
Reverse Transkriptase, Random Primer	Amersham
RNase	Roche
RNase-Inhibitor	Stratagene
T4-DNA-Ligase	Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	Amersham

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Erstantikörper

Unkonjugierter Antikörper aus Kaninchen polyklonal gegen Tbx5 (murin und human)	Abcam
FITC-konjugiert Mouse Anti-Human CD4	BD Pharmingen
PE-konjugiert Mouse Anti-Human CD4	BD Pharmingen
Monoklonaler Antikörper Mouse Anti- α -Actinin (Sarcomeric)	Sigma
Connexin 43 Rabbit Anti-Mouse	Alpha Diagnostic International

2.1.3.2 Zweitantikörper

Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec
Cy3-konjugiert Goat Anti-Rabbit (IgG)	Jackson ImmunoResearch
Cy3-konjugiert Sheep Anti-Mouse (IgG)	Sigma
Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper	Sigma
Mouse monoclonal to Rabbit (IgG)	
Alexa Fluor®488-konjugiert Goat Anti-Rabbit (IgG)	Invitrogen
Alexa Fluor®488-konjugiert Goat Anti-Mouse (IgG)	Invitrogen

2.1.3.3 Isotypkontrollen

Purified Mouse IgG ₁ Isotype Control	BD Pharmingen
Purified Rabbit IgG Isotype Control	BD Pharmingen
FITC Mouse IgG ₁ κ Isotype Control	BD Pharmingen
Purified Mouse IgG ₁ Alexa Fluor®488-konjugiert	Invitrogen

2.1.4 Sonstige Reagenzien für Immunfärbungen

Phalloidin Alexa Fluor®594-konjugiert	Invitrogen
---------------------------------------	------------

2.1.5 Zellkultur**2.1.5.1 Zellen**

Murine ES-Zellen der Linie GSES vom Mäusestamm Agouti 120/SV	Dr. M. Aguet ISREC, Lausanne
---	---------------------------------

2.1.5.2 Zellkultur-Materialien

Bakterienkulturschalen	Greiner
DMSO	Sigma
Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose	Gibco
FCS	Biochrom
Formalin 37%	Merck
Gelatine, porcine	Sigma
Geneticinsulphat (G418)	Gibco
Glasdeckscheiben	Marienfeld
Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium	Sigma
Kryo-Tube Einfrier-Röhrchen	Nunc
L-Glutamin	Gibco
LIF (ESGRO)	Chemicon International
MEM	Gibco
PBS (ohne Calcium, Magnesium, Natriumbicarbonat)	Gibco
Penicillin (U/ml)/Streptomycin (µg/ml)	Gibco
β-Mercaptoethanol	Merck
Trypsin-EDTA	Gibco

Zelkulturschalen (6-, 24-Loch-Platten, 10cm-Kulturschalen)	Greiner
Zellkulturflaschen (T75, T150)	TPP
Zentrifugenröhrchen	GPK
α -Monothioglycerol	Sigma

2.1.6 Bakterienkultur

2.1.6.1 Bakterien

E.coli-Bakterien TOP 10	Invitrogen
-------------------------	------------

2.1.6.2 Bakterienkultur-Materialien

Bacto-Agar	Difco
Hefe	Roth
NaCl	Roth
Pepton	Roth
SOC-Medium	Invitrogen

2.1.7 Laborgeräte und sonstige Materialien

Blotkammer	BioRad
Brutschrank IG 150	Jouan
DNA Star Software	DNA STAR, Inc.
Einfrierbehälter	Nalgene
Elektoporationsgerät	BioRad Gene Pulse II
Elektroporationsküvette	Peqlab
FACS (Analysegerät)	Beckman Coulter Epics XL
FACS-Analysesoftware	EXPO 32 ADC
FACS (Analysegerät)	Becton Dickinson FACSCalibur
Filmentwickler	Du Pont DP 250 Daylight Processor
Filmmaterial	Amersham
Gelelektrophoresekammer	BioRad
Gel-Extraktions-Kit	Qiagen
Gel-Videokamera	BioRad Gel Doc 2000
Heizblock	HBT 130 HLC
MACS-Gerät	Mini MACS Miltenyi Biotec

MACS-Säulen	Mini MACS Miltenyi Biotec
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 200
Mikroskop-Photokamera	Carl Zeiss Axio Cam HRc
Mikroskop-Videokamera	Sony DCR-TRV19E
Photometer	Tecan
Pipettierhilfe	Hirschmann
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Plasmidpräparations-Kit	Qiagen
PVDF-Membran	Zefa
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt
Realtime RT-PCR Cycler	Biorad iCycler und MyiQ detection system
Realtime RT-PCR Polymerase-Mix	Biorad IQ SYBR Green Super Mix kit
RNA-Extraktions-Kit	Qiagen
Rollermischer	Stuart
Rundschüttler	Certomat K Braun
Schwenktisch	Heidolph
Sterilbänke	Jouan 12 MSC
	Heraeus HERA Safe
Sterilfilter	Nalgene
Sterilkompressen	NOBA Verbandsmittel, Danz GmbH
Thermocycler	Biometra T personal
TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Ultraschallbad	Sonorex RK 1065
UV-Lampen	Osram Mercury Short Arc Photooptic Lamp
	HBO
Wasserbad	W 12 Medingen
Whatman-Papier	Whatman
Zentrifugen	Jouan BR 4
	Hettich-Zentrifuge Mikro 20
Gelelektrophorese Marker 100 bp-Ladder	Biolabs
Gelelektrophorese Marker 1 kb-Ladder	Biolabs
Gelelektrophorese Marker λ -HindIII	Biolabs

2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.8.1 ES-Zellkultur und -analyse

Kultivierungsmedium undifferenzierter Zellen („Kultivierungsmedium“)	500 ml Dubecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose 10 Vol% FCS 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1x MEM nichtessentielle Aminosäuren 1000 U/ml LIF 0,1 mM β-Mercaptoethanol zur Selektion: 0,4 g/l G418
Kultivierungsmedium differenzierter Zellen („Differenzierungsmedium“)	500 ml Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium 10 Vol% FCS 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 x MEM nichtessentielle Aminosäuren 0,004 Vol% α-Monothioglycerol
Einfriermedium (Kryomedium)	50 Vol% FCS 40 Vol% Kultivierungsmedium 10 Vol% DMSO
Fixierungslösung (intrazelluläres FACS)	133,15 ml H ₂ O bidest 14,85 ml 10x PBS 1 ml Formalin 37%
Permeabilisierungslösung	44 ml H ₂ O bidest 5 ml 10x PBS 1 ml Tween 20 (10%)
Zellvereinzellungslösung (extrazelluläres FACS)	5 mM EDTA PBS

FACS-Puffer	1 g% BSA PBS
MACS-Puffer (pH 7,2)	50ml PBS 250 mg BSA 250 µl 0,5 M EDTA (pH= 8,0)

2.1.8.2 Bakterienkultur und Plasmidpräparation

YT-Medium mit Kanamycin (pH 7,2)	10 g Hefe 50 mg Kanamycin 5 g NaCl 16 g Pepton Angesetzt auf 1 l Aqua Bidest
YT-Platten	YT-Medium mit Kanamycin (pH 7,2) Bacto-Agar 15 g/l
TELT-Puffer (pH 7,5)	50 mM Tris 62,5 mM EDTA 2,5 M LiCl 0,4 Vol% Triton X-100
TE-Puffer	1 mM EDTA (pH 8,0) 10 mM TrisHCl (pH 8,0) 20 µg/ml RNase
Phenol	gepuffert in TE, pH 8,0 0,1 Vol% Hydroxychinolin
Phenol/Chloroform	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat (pH 8,0) 950 mM Essigsäure 50 mM EDTA

2.1.8.3 Proteinbiochemische Methoden

Lysepuffer für Proteinextraktion	25x Complete 10 mM Vanadate 500 mM NaF 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% Triton X-100
Ladepuffer 5x für SDS-PAGE	5 ml H ₂ O 10 ml Glycerol 100% 1,55 g DTT 5 ml Trispuffer 1M pH 6,8 2 g SDS 0,025 Bromphenolblau
Trenngelpuffer 4x	1,5 M TrisHCl 0,4% SDS in 300 ml H ₂ O lösen, mit HCl auf pH 8,8 titrieren, Endvolumen 500 ml
Sammelgelpuffer 4x	0,5 M TrisHCl 0,4% SDS in 300 ml H ₂ O lösen, mit HCl auf pH 6,8 titrieren, Endvolumen 500 ml
SDS-Page-Trenngel 12% (20-60 kDa)	9 ml Acrylamid/Bisacrylamid 5,6 ml Trenngelpuffer 7,9 ml H ₂ O 180 µl APS 10% 7,5 µl TEMED
SDS-Page-Sammelgel	910 µl Acrylamid/Bisacrylamid 1,75 ml Sammelgelpuffer

	4,27 ml H ₂ O
	37,5 µl APS 10%
	7,5 µl TEMED
Runningbuffer 10x (Elphopuffer)	288 g Glycin
	60 g Tris base
	20 g SDS
	auf 2 l mit H ₂ O auffüllen
Towbin Transferpuffer 10x (Blotpuffer)	3,5 l H ₂ O
	1 l Methanol
	0,5 l 10x Runningbuffer
Block-Puffer für Immunmarkierung	PBS, pH 7,2
	10% Magermilchpulver

Medien, Lösungen, Glasbehälter und Kunststoffmaterialien wurden für 20 min bei 134°C und 2 bar autoklaviert. Die Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0,2 µm).

2.1.9 Plasmide

pEGFP-N1	Firma Clontech
pTbx5-ΔCD4	in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hergestellt

2.1.10 Oligonukleotide

Die gereinigten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

Legende:

up	=	„sense“
lo	=	„anti-sense“
„Zahl“	=	Position der ersten bzw. letzten Primerbase im ORF des jeweiligen Gens
„Kleinbuchstabe“	=	Schnittstelle für Restriktionsendonuklease (z.B. HindIII, KpnI, EcoRI) im Klonierungs-primer

Folgende Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur **Amplifizierung** des CMV-Enhancers genutzt, die jeweils Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen enthielten:

CMV upHindIII	5'GCGaagcttAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC3'
CMV loKpnI	5'GATggtaccATGGGGCGGAGTTGTTACG3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die **Sequenzierung** des klonierten CMV-TBX5-ΔCD4-Plasmids eingesetzt:

CMV up (seq-Primer) 5' AATCAATTACGGGGTCATTAGTTC3'
EGFP seq4104 5' CCTGCGTTATCCCCTGATTC3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die qRT-PCR zur Quantifizierung der Expression von murinen Markergenen eingesetzt:

Bezeichnung Oligo	Bezeichnung Markergen	Basensequenz
mANF up593 BOH	ANP	5' TTCCTCGTCTTGGCCTTTTG3'
mANF lo831 BOH		5' CCTCATCTTCTACCGGCATCTTC3'
Cx40 up43	Connexin 40	5' CACAAGCACTCCACAGTCATC3'
Cx40 lo426		5' CCTTCCTGCACTACTTTCTC3'
mCx43 up76	Connexin 43	5' CTGTCGGTGCTCTTCATTTTC3'
mCx43 lo226		5' GTGGGCACAGACACGAATATG3'
mGATA4 up641	Gata4	5' GAGAGTGTGTCAATTGTGGG3'
mGATA4 lo1058		5' GTGGCATTGCTGGAGTTAC3'
mH4 up64	Histon-H4-Ladekontrolle	5' GTTCTCCGCGATAACATCC3'
mH4 lo189		5' CAGGAACACCTTCAGCACAC3'
mMESP1 Fl up604	Mesp1	5' CAGTACGCAGAAACAGCATC3'
mMESP1 Fl lo699		5' GGTTTCTAGAAGAGCCAGCA3'
Nkx2.5 up270	Nkx2.5	5' CATTTACCCGGGAGCCTACG3'
Nkx2.5 lo395		5' GCTTTCCGTCGCCGCCGTGCGCGTG3'
mTBX5 up41	T-Box 5	5' CTCTGGAGCCTGATTCCAAAG3'
mTBX5 lo382		5' CTGCTTTGCCAGTTACGGAC3'
mTBX20 up577	T-Box 20	5' GAGCAGCTCCTCAAACAGAT3'
mTBX20 lo684		5' TGGCTGGTACTTATGCATTG3'
dCD4 Age1up	ΔCD4	5' GATCCACCGGTCGCCACCATG AACCGGGGAGTCCCTT3'
dCD4 lo473		5' GGACTCCTACATTGCACTG3'

2.2 Methoden

Folgende Methoden stellen Standardprotokolle unserer Arbeitsgruppe dar, wenn nicht anders explizit vermerkt.

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

E.coli-Stämme wurden unter Kanamycingabe (50 µg/ml) für 14-16 h bei 37 °C im Schüttler (225 Upm) herangezchtet. Für die analytische Plasmidpräparation wurden 3-4 ml Kanamycin enthaltendes YT-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft; für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurden 250 ml Kanamycin enthaltendes YT-Medium mit 1 ml einer Bakterien-Übernacht-Kultur verwendet.

2.2.1.2 Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Bei der Transformation wird Fremd-DNA in Bakterien eingeschleust. Hierbei stellt die Hitzeschockmethode eine Standardtechnik in der Molekularbiologie dar.

Zur DNA-Transformation in E.coli wurden 50 µl kompetente (d.h. Bakterien, die in der Lage sind, DNA aufzunehmen) TOP10 E.coli-Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 7,5 µl des Ligationsansatzes (s. 2.2.2.2.3) gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden die Bakterien zur Entwicklung der Antibiotikaresistenz mit 250 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C im Schüttler (225 Upm) inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz auf Kanamycin enthaltenden YT-Platten mit Hilfe eines Drygalski-Spatels ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 DNA-Methoden

2.2.2.1 DNA-Präparation und -Aufreinigung

2.2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die DNA-Plasmidpräparation erfolgte aus den zuvor transformierten E.coli Bakterien. Dabei wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert und anschließend in verschiedenen Waschschritten gereinigt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte entweder zur Gewinnung größerer DNA-Mengen mit dem Qiagen MaxiKit als Maxipräparation oder- zu analytischen Zwecken- als Mini- bzw. -TELT-Präparation nach der Lyse-Methode.

2.2.2.1.1.1 TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA

Aus den transformierten Bakterien wurde mittels der Minipräparation eine kleinere Menge rekombinanter Plasmid-DNA isoliert, die anschließend zur Analyse der Sequenzierung verwendet wurden. Die Methode dient der schnellen Gewinnung von Plasmid-DNA zur Kontrolle der Vektoren auf das korrekte Insert.

Dafür wurde zunächst das Bakteriensediment einer 3-4 ml Übernachtskultur (5000 Upm, 5 min, Raumtemperatur) in 150 µl TELT-Puffer und 15 µl Lysozym durch starkes Schütteln (Vortex) resuspendiert und 5 min inkubiert (Raumtemperatur), um eine Bakterienlyse zu erreichen. Durch Kochen bei 95 °C über 120 s erfolgte die Denaturierung des Lysozyms und der bakteriellen Proteine. Chromosomale DNA und Proteine wurden durch Inkubation auf Eis (5 min) gefällt und anschließend abzentrifugiert (14000 Upm, 20 min, 4 °C). Die im Überstand enthaltenen Plasmide wurden durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol präzipitiert (5 min, Raumtemperatur) und abzentrifugiert (14000 Upm, 10 min, Raumtemperatur). Nach einem Waschschriff mit 70%igem Ethanol wurde die Plasmid-DNA luftgetrocknet (10 min), in 25-30 µl TE resuspendiert und über 5 min bei 65 °C zum Abbau der RNA durch die zugesetzte RNase inkubiert. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 1-2 µl von der auf diese Weise gewonnenen Plasmid-DNA-Lösung verwendet.

2.2.2.1.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiagen MaxiKit verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurde eine 100-200 ml Übernachtskultur der transformierten E.coli Bakterien mit den Kit-Komponenten zunächst einer alkalischen Lyse unterzogen, um eine Zellwandzerstörung der Bakterien zu erreichen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule gereinigt und am Ende mittels Isopropanolfällung aufkonzentriert.

2.2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Proteinverunreinigungen in den DNA-Lösungen wurden durch Phenolextraktion entfernt. Die DNA wurde hierbei mit dem gleichen Volumen Phenol bzw. Phenol/Chloroform versetzt, durch kräftiges Schütteln (Vortex) gemischt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (13000 Upm, 3 min, 4 °C). Die DNA-enhaltende wässrige Oberphase wurde abgenommen und es erfolgte eine weitere Extraktion nur mit Chloroform, um noch vorhandene Reste von Phenol aus der wässrigen Phase zu entfernen. Die Nukleinsäuren wurden im Anschluss mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt.

2.2.2.1.3 Ethanolfällung

Mittels Ethanolfällung kann eine DNA-Menge aus wässrigen Lösungen konzentriert und freie Nukleotide und Salze entfernt werden.

Hierfür wurde TE (pH 8,0) bis zu einem Volumen von 150 µl hinzugefügt und es erfolgte anschließend eine Zugabe von 3 Volumen Ethanol (96%, vorgekühlt auf -20 °C) und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2). Nach kräftigem Schütteln (Vortex) erfolgte die Präzipitation bei -20 °C für 30 min. Danach wurde das Präzipitat bei 4 °C für 20 min (14000 Upm) abzentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung (10 min) wurde die DNA im gewünschten Volumen TE (pH 8,0) gelöst.

2.2.2.1.4 Isopropanolfällung

Die Isopropanolfällung kann anstelle der Ethanolfällung analog angewendet werden und ist zu bevorzugen, wenn das Volumen der vorliegenden DNA-Lösung groß ist. Zur DNA-Lösung wurde 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben. Das dabei ausgebildete Präzipitat wurde bei 4 °C 60 min abzentrifugiert; Waschen und Lösen des Sediments erfolgte wie für die Ethanolfällung beschrieben.

2.2.2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment in einen Vektor eingeführt. In der vorliegenden Arbeit sollte in den vorbestehenden Vektor pTbx5-ΔCD4 ein CMV-Enhancerelement eingeführt werden. Dabei wurden zunächst der vorbestehende Vektor und das DNA-Fragment verdaut und in einer Gelelektrophorese von unerwünschter Rest-DNA getrennt und gereinigt. Der Vektor wurde dephosphoryliert, um danach mit dem DNA-Fragment ligiert zu werden. Anschließend wurde das hergestellte neue Plasmid sequenziert.

2.2.2.2.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Der analytische Verdau wurde mit 500 ng Plasmid-DNA und 2,5 U des entsprechenden Restriktionsenzym in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern in einem Volumen von 10 bis 30 µl durchgeführt (37 °C, 1-2 h). Die Analyse der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.2.2.4).

Präparativer Verdau erfolgte zur Linearisierung von Vektor-DNA aus 5 µg DNA und 5-10 U des entsprechenden Restriktionsenzym und den entsprechenden Puffern in einem Gesamtvo-

lumen von 100 µl (37 °C, 4-6 h). Erhaltene Fragmente wurden nach Auftrennung im Agarosegel isoliert (s. 2.2.2.2.5).

2.2.2.2.2 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Um zu verhindern, dass bei der Ligation eine Religation des Ausgangsvektors erfolgte, wurden mit dem Enzym CIP („*calf intestine phosphatase*“) die 5'-Phosphatgruppen aus dem zuvor linearisierten Ausgangsvektor entfernt. Hierfür wurden zum hydrolysierten Vektor 1 Volumen 1x CIP-Puffer und 3 U CIP hinzugegeben und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde nach einer präparativen Gelelektrophorese (s. 2.2.2.2.5) die gewünschte Vektorbande aus der Agarose isoliert und für die Ligation eingesetzt.

2.2.2.2.3 Ligation

Für die Ligation wurde der vorbereitete Vektor (50-100 ng) mit einem zwei- bis-vierfach molaren Überschuss an Insert-Fragment-DNA in 15 µl Reaktionspuffer und 0,5 U T4-DNA-Ligase inkubiert (1 Stunde, Raumtemperatur). Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von E.coli-Bakterien eingesetzt (s. 2.2.1.2).

2.2.2.2.4 Analytische Gelelektrophorese

Die analytische Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR nach ihrer Größe aufzutrennen und dementsprechend analysieren zu können. Die DNA wurde dabei in Agarosegelen (Konzentrationen von 0,8-2% je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente) aufgetrennt. Zur Gelherstellung wurde Agarose in TAE-Puffer in einer Mikrowelle verflüssigt. Nach Abkühlen des Gemischs wurde 0,5 mg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und im Anschluss in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Erstarren der Agarose (30 min, Raumtemperatur) wurde das Gel mit TAE-Elektrophoresepuffer überschichtet, die Proben mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Gel-taschen pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 60-120 V. Als Größenstandard wurden eine 100 bp-Leiter, 1kb-Leiter und ein λ-HindIII-Marker verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Fragmente auf einem Transluminator (260 und 355 nm) durch Interkalation des zugesetzten Ethidiumbromids mit der DNA sichtbar gemacht und mit einer Videokamera fotografiert.

2.2.2.2.5 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um bestimmte DNA-Fragmente zu isolieren und sie von unerwünschter DNA abzutrennen. Nach der Elektrophorese (analog zu 2.2.2.2.4) wurde die gewünschte Bande aus dem 1%igen Agarosegel auf einem UV-Durchlicht-Tisch mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Isolierung des gewünschten DNA-Fragments aus der herausgeschnittenen Bande erfolgte mit dem Qiagen-Gelextraktionskit gemäß den Herstellerangaben.

2.2.2.2.6 Sequenzierung der Plasmide

Die hergestellten Plasmide wurden nach der analytischen Gelelektrophorese zur Bestätigung der korrekten Ligation der DNA-Fragmente und zum Ausschluss von Mutationen durch die Firma MWG-Biotech sequenziert. Dazu wurden neben dem Plasmid jeweils geeignete Sequenzierungsprimer (s. 2.1.10) eingesandt.

2.2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe einer PCR lassen sich bestimmte Bereiche einer beliebigen Desoxyribonukleinsäure als Template gezielt vervielfältigen. Ein PCR-Zyklus besteht dabei aus einem Denaturierungsschritt (Trennung der beiden DNA-Stränge), einem Annealingschritt (spezifisches Anlagern der Primer an die einzelsträngige DNA) und einem Elongationsschritt (enzymatisches Auffüllen der fehlenden Stränge mit Nukleotiden).

2.2.2.3.1 PCR zur Gewinnung der kodierenden Sequenz des CMV-Enhancerelements

Die kodierende Sequenz des CMV-Enhancerelement-Gens mit der passenden Schnittstelle für den späteren Vektor pCMV-TBX5-ΔCD4 wurde aus dem Vektor pEGFP-N1 mittels PCR gewonnen. 1 µl DNA wurde mit 5 µl 10fach Puffer, 5 µl Primermix mit dementsprechenden Schnittstellen (up HindIII, lo Kpn1 für TBX5 (s. 2.1.10)), 10 µl dNTP (2,5 mMol) und 2 µl Pfu-Polymerase als Enzym (eine thermostabile DNA-Polymerase) gemischt und mit H₂O auf einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt. Vor Beginn der PCR wurde- um eine vollständige Doppelstrangtrennung zu erreichen- eine 2-minütige Denaturierung (94 °C) durchgeführt. Die Annealingtemperatur richtete sich nach den verwendeten Primern und wurde nach der Faustregel berechnet, bei welcher Schmelztemperatur T_m 50% des jeweiligen Primers nicht mehr an das Template bindet. Folgende Faustregel erlaubte die Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m) der Primerpaare:

$$T_m = 2\text{ °C} \times \Sigma (A+T) + 4\text{ °C} \times \Sigma (G+C)$$

In der Praxis wurde eine Annealingtemperatur verwendet, die 3-4 °C unter der errechneten Temperatur lag (ca. 58 °C). Für die Enzymreaktion (bzw. den Elongationsschritt) wurden 72 °C gewählt. Die Reaktionszeit betrug ca. 1 min pro 1000 bp, für Annealing und Denaturierung jeweils 1 min. Nach Abschluss der Zyklen gab es eine 8-minütige 72 °C-Phase, um eine Komplettierung aller Doppelstränge sicherzustellen. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Ansätze mit Mineralöl (ca. 30 µl pro Ansatz) überschichtet. Nach Abschluss von 30 Zyklen wurden die PCR-Produkte mit 1 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2.3.2 Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Expression von Markergenen

Die Real-Time-PCR erlaubt die Quantifizierung von DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Im Gegensatz zur konventionellen PCR erfolgt die Messung der Anzahl entstandener Kopien direkt nach jedem Zyklus. Die Messung erfolgt durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe. Der hier verwendete SYBR-Green-Farbstoff lagert sich an doppelsträngige DNA an, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe stark ansteigt. Die Zunahme der DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Bevor ein Signal detektiert wird, wird allerdings eine Mindestmenge an DNA-Molekülen benötigt. Als Signalgrenzwert („*threshold*“) gilt der Fluoreszenzwert, der der 10fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. Der Moment des Überschreitens des Signalgrenzwertes wird als Durchbruchzyklus CT („*cycle threshold*“) definiert. Am Ende eines Laufs wird mit Hilfe der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen.

Die nach dem Magnetic Cell Sorting isolierte mRNA, welche in cDNA revers transkribiert worden war (s. 2.2.3), wurde für die Quantifizierung der Expression von Markergenen mittels Real-Time-PCR verwendet. Basierend auf den cDNA-Sequenzen der untersuchten Markergene wurden geeignete Primerpaare mit der DNA-Star-Software entworfen (s. 2.1.10). Die Spezifität jedes Primer-Paares wurde durch Agarose-Gelelektrophorese bestätigt.

Die Real-Time-PCR wurde an einem iCycler mit dem MyiQ Detection System und dem SYBR Green Super Mix Kit durchgeführt. Die Annealing Temperatur betrug für alle Primerpaare 57 °C. Alle Proben wurden zweifach bestimmt. Als Negativkontrolle wurde Gesamt-RNA von jeder Probe ohne Reverse Transkriptase laufen gelassen- ein erst nach 40 Zyklen detektiertes Signal wurde als DNA-Kontamination oder unspezifisch gewertet. Die Analyse der DNA-Menge erfolgte mit der Δ CT-Methode (Δ CT = CT-Referenzgen – CT-Targetgen). Änderungen der relativen mRNA-Expression wurden mittels murinem Histon 4 (H4; Fragment: bp 139-254, Anne-

altingtemperatur 57 °C) als Referenzgen errechnet, wobei der Wert in Kontroll-ES-Zellen als 100% definiert wurde.

2.2.3 RNA-Methoden

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus GSES-Zellen nach MACS-Aufreinigung

Das nach MACS gewonnene Zellmaterial (jeweils etwa 150 µl Zellmaterial pro MACS-Fraktion (s.2.2.7)) wurde abzentrifugiert (2500 Upm, 3 min, Raumtemperatur). Anschließend wurde die im Zellmaterial enthaltene RNA mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits den Herstellerangaben entsprechend (Protokoll für tierische Zellen) isoliert und in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte ein DNA-Verdau mit Hilfe des DNase I Amplification Grade Kits den Herstellerangaben entsprechend, um eine Kontamination der RNA mit DNA zu vermeiden. Die Aufbewahrung der gereinigten RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA wurden je 2 µl der isolierten Gesamt-RNA (s. 2.2.3.1) eingesetzt. Die Reaktion mit Omniscript Reverser Transkriptase (4 U) erfolgte mit Hilfe des Omniscript RT-Kits den Herstellerangaben entsprechend (Gesamtvolumen von 20 µl für 60 min bei 37 °C). Zusätzlich wurde ein RNase-Inhibitor (24 U/0,25 µl) eingesetzt, um einen vorzeitigen RNA-Abbau zu verhindern. Anschließend wurde die gewonnene cDNA-Lösung bei -80 °C aufbewahrt. Für Real-Time-PCRs konnten von dieser Verdünnung direkt je 1 µg eingesetzt werden.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Um semiquantitative Aussagen von bestimmten Proteinmengen machen zu können, wird häufig das Verfahren der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot angewendet. Dabei werden Proteine aus Zellen extrahiert und eine definierte Proteinmenge auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Gel wird eine Spannung angelegt und die Proteine trennen sich nach ihrem Molekulargewicht auf. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine mittels eines gerichteten Stromflusses aus dem Gel auf eine Membran übertragen (Western Blot). Im nächsten Schritt werden die zu untersuchenden Proteine mittels indirekter Immunmarkierung markiert. Dabei ist der sekundäre Antikörper an ein Enzym gekoppelt (Peroxidase), welches mit einer zugesetzten Entwicklerlösung reagiert und so das Protein als eine Bande auf dem Gel sichtbar macht.

2.2.4.1 Gesamt-Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Die verschiedenen Zellfraktionen, die nach MACS gewonnen worden waren (s. 2.2.7), wurden mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (1400 Upm, 5 min). Die jeweiligen Sedimente wurden anschließend in 10-15 µl des Lysepuffers (s. 2.1.8.3) 1 h im Thermomixer auf Eis lysiert und anschließend abzentrifugiert (14000 Upm, 20 min, 4 °C). Danach konnte der Überstand der Proben (=Lysat) direkt für die SDS-PAGE eingesetzt werden.

Für die Proteinbestimmung wurden 1 µl der Probe und 200 µl Bradfordlösung mit Wasser in einem Gesamtvolumen von 1 ml verdünnt. Als Negativkontrolle diente Lysepuffer. Nach fünfminütiger Inkubationszeit kam es zu einem Farbumschlag nach blau, wenn Protein in der Probe vorhanden war. Die Probe wurde zügig in einem Photometer gemessen und die Proteinkonzentration errechnet, um für weitere Versuche bei allen Proben die exakt selbe Menge an Protein einzusetzen.

2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung wurde mit diskontinuierlicher SDS-PAGE mit separat gegossenen Sammel- und Trenngelen nach Lämmli [259] in einer Minigelapparatur durchgeführt.

Die Herstellung des 12%igen Trenngels erfolgte in einer Gelgießapparatur zwischen zwei mit Ethanol gereinigten Glasscheiben und Übersichten mit 70%igem Ethanol, um eine glatte Oberfläche zu erhalten (30 min). Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet (2,5 ml pro Trenngel). Durch Einsetzen eines Kammes wurden Taschen zur Probenaufnahme geschaffen. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Taschen mit H₂O bidest gespült. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x Runningbuffer gefüllt und das Gel darin eingespannt. Die Lysate (s. 2.2.4.1) wurden mit Lade- und Lysepuffer auf Eis zusammen pipettiert und für 5 min bei 96 °C zur Denaturierung der Proteine aufgekocht und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Gelkammern pipettiert und es erfolgte eine Gelelektrophorese bei einer konstanten Spannung von 130 V (1 h). Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmolekulargewichtsstandard verwendet.

2.2.4.3 Western Blot

Mittels Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine in einem Nassblotverfahren nach Towbin [260] auf eine Trägermembran übertragen und immobilisiert.

PVDF-Membran und Whatmanfilterpapiere wurden entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. Das Elektrophoresegel (s. 2.2.4.2) wurde auf die

PVDF-Membran luftblasenfrei aufgebracht und „sandwichartig“ zwischen je drei feuchte Whatmanfilterpapiere und einem Schwamm gelegt. Mit Hilfe eines zusammenklappbaren Gitters wurde der Aufbau in die Blotapparatur gestellt, dass die PVDF-Membran- bei einem Transfer der Proteine vom Gel in Richtung Anode- auf der Seite der Anode lag. Unter konstanter Spannung von 30 V wurde ca. 1 h transferiert (1 kDa/min). Im Anschluss wurde zur Kontrolle des erfolgreichen Proteintransfers die PVDF-Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt (bzw. später wieder entfärbt mit 5% Milch-BSA sowie 0,05%igen Tween) und die Markerbanden gekennzeichnet. Die Membran wurde anschließend für die Immunmarkierung (s. 2.2.4.4) eingesetzt.

2.2.4.4 Immunmarkierung von Proteinen auf Western-Blot-Membranen

Vor der Immunreaktion wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran für 30-60 min in Block-Puffer unter leichtem Schwenken abgesättigt. Die Membran wurde anschließend mit dem primären Tbx5-Antikörper in 5% Milch (1:1000) über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Nach dreimaligem 7-minütigem Waschen der Membran in 0,1%igem PBS-Tween wurde diese mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1: 10000 in 5% Milch) 1-2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x7 min in 0,1% PBS-Tween) und einem anschließenden Waschschrift mit reinem PBS wurden die gebundenen Antikörper mit dem ECL-Western-Blot-Detektions-System in der Radioaktivitätskassette nachgewiesen. Schließlich wurde die Membran mit Chemlumineszenzfarbstoff inkubiert. Zur Dokumentation der luminszierenden Membranen wurden Hyperfilm ECL Filmfolien belichtet.

2.2.5 Zellkulturmethoden

Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen waren autoklaviert oder steril filtriert und wurden in der Regel vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt.

2.2.5.1 Kultivierung der Zellen

GSES (murine embryonale Stammzellen) wurden in undifferenziertem Zustand in 2.1.8.1 beschriebenem Kultivierungsmedium feederzellfrei mit LIF gezogen, wodurch eine spontane Differenzierung der ES-Zellen verhindert wurde [87, 90]. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂. Es wurden 10 cm-Schalen (10 ml Medium), T75-Flaschen (15 ml Medium) oder T150-Flaschen (25 ml Medium) verwendet, welche davor mit 0,1%iger porciner Gelatine beschichtet worden waren, um eine Zelladhärenz zu verbessern (mind. 15 min, 37 °C). Das Kulturmedium der ES-Zellen wurde jeden zweiten Tag erneuert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70% durch Trypsinie-

rung passagiert: hierfür wurden sie mit PBS zweifach gewaschen (5-10 ml) und mit 1-4 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank für 5 min inkubiert, so dass sie leicht ablösbar waren. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde dann durch Zugabe von 5-15 ml des FCS-haltigen Kultivierungsmediums gestoppt (die jeweiligen eingesetzten Mengen waren abhängig von der verwendeten Flaschengröße). Die Zellen wurden von der Kulturschale abgespült, in Röhrchen gesammelt und abzentrifugiert (1200 Upm, Raumtemperatur, 5 min). Anschließend wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:5-1:20 erneut ausgesät.

2.2.5.2 Konservierung der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen- wie unter 2.2.5.1 beschrieben- mit Trypsin von den Zellkulturplatten abgelöst und abzentrifugiert. Die Resuspension erfolgte unter tropfenweiser Zugabe des auf Eis vorgekühlten Einfriermediums (1 ml) mit ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml pro Röhrchen. Die Zellen wurden anschließend kontrolliert (1 °C/min) in einem Einfrierbehälter auf -80 °C weggefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die Zellen wiederaufzutauen, wurden die Einfrier Röhrchen ca. 1 min in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut. Anschließend wurde die noch gefrorene Zellsuspension in ein 15 ml-Gefäß überführt, mit 10 ml Kultivierungsmedium verdünnt und sofort abzentrifugiert, so dass das DMSO-enhaltende Einfriermedium zügig abgesaugt werden konnte. Die Zellen wurden anschließend in Kultivierungsmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Zellkulturschale pro Einfrier Röhrchen ausplattiert.

2.2.5.3 Transfektion mittels Elektroporation

Durch Transfektion konnte der zuvor klonierte Vektor (s. 2.2.2.2) in murine embryonale Stammzellen stabil eingebracht werden. Dies geschah mit der Methode der Elektroporation, bei der die Membran einer Zelle durch Spannungspulse für DNA permeabel gemacht wird und so die DNA-Aufnahme in eine Zelle möglich ist. Vor der Transfektion wurden die Zellen- wie unter 2.2.5.1 beschrieben- trypsiniert und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS bei einem Titer von $3 \times 10^7/800$ µl aufgenommen und zusammen mit 3 µg der Phenol-Chloroformgereinigten Plasmid-DNA (2.2.2.1) in eine 0,4 cm Elektroden-Küvette pipettiert. Nach mehrmaligem Schwenken der Küvette erfolgte die Elektroporation bei 240 V und 500 µF, wobei die Zeitkonstante zwischen 6,5 und 7,5 s lag (Bio-Rad Gene Pulse II). Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension auf gelatinierte Zellkulturschalen mit 10 ml Medium ausgesät.

2.2.5.4 Selektion mit Geneticinsulphat und Separation von Einzelklonen

Die Selektion stabiler Klone begann ca. 24 h nach Elektroporation unter Zugabe von 0,4 mg Geneticinsulphat (G418) pro ml Kultivierungsmedium. Diese Selektion war durch das in den transfizierten Vektor integrierte G418-Resistenzgen möglich (s. 3.1). Nach täglichem Mediumwechsel konnten nach 9-11 Tagen Einzelzellklone aus den Zellkulturschalen isoliert werden. Hierfür wurden die Schalen zweifach mit 8 ml PBS gewaschen und mit 4 ml PBS überschichtet. Eine Zellkolonie wurde mit einer 1000 µl-Eppendorf-Pipette in 40 µl PBS aufgenommen, anschließend in 50 µl 1 x PBS-EDTA für 5 min inkubiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in einer 200 µl-Eppendorf-Pipette vereinzelt. Anschließend erfolgte eine Umsetzung in eine 24-Lochplatte mit 1 ml G418-Kultivierungsmedium. Auf diese Weise wurden ca. 25 Klone pro transfiziertem Konstrukt separiert und bis zu ca. 70%iger Konfluenz weitere 7-21 Tage unter Selektionsdruck gezogen.

2.2.5.5 Differenzierung der Zellen

Die Differenzierung der Zellen erfolgte in dem unter 2.1.8.1 beschriebenen Differenzierungsmedium. Nach Abtrypsinieren und Abzentrifugieren der Zellen wurden ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen in 10 ml Differenzierungsmedium resuspendiert und in 10 cm-Bakterienschalen kultiviert, welche eine Zelladhärenz verhindern und somit eine Suspensionskultur ermöglichen. Dabei formten die Zellen Aggregate, aus denen sich Embryoid-Körperchen (EBs) entwickelten. Diese bestanden nach 6-tägiger Suspensionsphase mit mehrmaligem Mediumwechsel aus etwa jeweils 2500 Zellen und wurden am Tag 6 der Entwicklung in gelatinierte 24-Well-Zellkulturplatten (ca. 10-12 EBs pro Well) mit Differenzierungsmedium ausplattiert, wobei die Zellklumpen innerhalb von ein bis zwei Tagen adhärten und sich nach einigen Tagen spontan kontrahierende Areale bildeten (Adhärenzphase). Der Tag der Entwicklung wird im Folgenden differenziert in Suspensionsphase und Adhärenzphase angegeben, z.B. wird mit Tag 6 + 10 der zehnte Tag nach dem Ausplattieren bezeichnet, wenn nicht anders explizit vermerkt. Für Experimente mit größerem Bedarf an größerem Zellmaterial (z. B. FACS oder MACS) wurden bis zu 50 EBs in 6-Lochplatten oder 10 cm-Zellkulturschalen ausplattiert.

2.2.5.6 Elektrophysiologische Messung von spontan schlagenden Zellen

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Methode zur Untersuchung von Ionenkanälen in Zellmembranen. Hierbei wird ein kleiner Membranfleck („Patch“) durch das Aufsetzen einer mit leitfähiger Lösung gefüllten Patchpipette elektrisch von der Umgebung isoliert. Dadurch lassen sich Stromflüsse durch einzelne Ionenkanäle in der Zellmembran darstellen. Die folgende Untersuchungsmethode einschließlich dem vorliegenden Protokoll und ihre Ergebnisse wurden mit Hil-

fe von PD Dr. Juliane Stieber (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg) durchgeführt.

Für die elektrophysiologische Charakterisierung wurden die Zellen nach der magnetischen Zellaufreinigung (s. 2.2.7), Wiederausplattierung und Rekultivierung (s. 2.2.5) erneut vereinzelt. 17-24 Stunden nach der erneuten Vereinzellung wurden bei 37 °C in der Patchkonfiguration mit einem MultiClamp 700 B Verstärker (Axon Instruments, USA) die spontanen Aktionspotentiale und Ströme von schlagenden Kardiomyozyten gemessen und ausgewertet. Die Patch-Pipetten (Warner Instruments, USA) hatten dabei einen Widerstand von 6-9 MΩ und waren mit folgender intrazellulären Pipettenlösung befüllt: 10 mM NaCl, 130 mM K-Asp, 0,04 CaCl₂, 2 mM Mg-ATP, 10 HEPES, pH 7,2, eingestellt mit KOH. Für I_{to}-Messungen wurden eine extrazelluläre Badlösung (bestehend aus 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,0 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 5,5 mM D-Glukose, pH 7,4, eingestellt mit NaOH) verwendet. Zur Etablierung der *“perforated patches”* wurden kurz vor der Messung 200 µM Amphotericin B, gelöst in DMSO, zur Pipettenlösung gegeben. Nach dem Herstellen der *“perforated-patch”*-Verbindung zwischen Pipette und Zelle konnten einige Minuten lang stabil das Membranpotential bzw. spontan generierte Aktionspotentiale abgeleitet werden. Die abgeleiteten Aktionspotentiale wurden mittels pClamp 10.0 Software aufgenommen und später offline analysiert.

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)

Die Durchflusszytometrie stellt eine schnelle Methode zur Untersuchung von Oberflächenproteinen auf Zellen und- nach Zellpermeabilisierung- intrazellulären Proteinen dar. Hierbei werden extra- oder intrazelluläre Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. FITC [Fluoresceinisothiocyanat], PE [Phycoerythrin], Cy3 [Cyanin 3]) gekoppelten Antikörpern gefärbt, wodurch gefärbten Zellen aufgrund ihrer emittierten Fluoreszenz im FACS hinsichtlich ihrer Proteineigenschaften analysiert werden können.

2.2.6.1 Extrazelluläre Färbung

Mittels FACS wurde die ΔCD4-Expression der transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen Tag 0 bis Tag 6 + 24 der Differenzierung) untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst vereinzelt, mit CD4-Antikörpern extrazellulär markiert und anschließend im FACS analysiert. Für Färbungen von Zellen, die sich innerhalb der ersten sechs Differenzierungstage befanden, wurden die Zellen in Eppendorf-Röhrchen gesammelt, abzentrifugiert (1200 Upm, 5 min), zweimal in PBS gewaschen, in PBS-EDTA (5mM EDTA) vereinzelt (Inkubationszeit 15 min) und anschließend erneut in PBS gewaschen. Bei weiter differenzierten Zellen (älter als Tag 6)- und gemäß dem Zellkulturprotokoll adhären Zellen- wurden die Zellen im Rahmen der

Zellvereinzelung von den Zellkulturschalen gelöst, in Eppendorf-Röhrchen überführt und ansonsten analog dazu vorgegangen. Die vereinzelter Zellen wurden anschließend mit dem CD4-Antikörper (PE-konjugiert Mouse Anti-Human) inkubiert (10 µl auf 200 µl FACS-Puffer; 60 min, 4 °C) und dann zweifach gewaschen. Die anschließenden analytischen Messungen wurden in gekühlten FACS-Puffer nach Zugabe von Propidiumjodid (0,05 mg/ml) zur Markierung der toten Zellen durchgeführt, um eine Beurteilung ausschließlich lebender Zellen zu ermöglichen.

Propidiumjodid (PI) diffundiert in nicht-vitale Zellen und färbt diese an, indem es an dsDNA bindet. PI kann die Zellmembran lebender Zellen nicht überwinden und wird daher als spezifischer Marker für avitale Zellen im FACS genutzt [261].

Für die FACS-Auswertung dienten native, nicht transfizierte, mit CD4-PE-Antikörpern markierte GSES als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen.

2.2.6.2 Intrazelluläre Färbung

Die adhärente Zellkultur (2×10^6 Zellen) wurde am 12. Differenzierungstag nach dem Ausplattieren (Tag 6 + 12) in 24-Lochplatten zweimalig mit PBS (1 ml pro Well) gewaschen und dann 1 h in einer gekühlten, Formalin-enthaltenden Fixierungslösung (1 ml) auf dem Schwenktisch bei 4 °C inkubiert. Nach Permeabilisierung mit einer Tween 20-enthaltenden Permeabilisierungslösung (1 ml; 15 min bei 37 °C) erfolgte die Zugabe von 1 ml 5% BSA-PBS und anschließend die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper (unkonjugierter Antikörper aus Kaninchen polyklonal gegen Tbx5; monoklonaler Antikörper Mouse Anti- α -Actinin (Sarcomeric); unkonjugierter Antikörper Connexin 43 Rabbit Anti-Mouse; über Nacht bei 4 °C Schwenktisch). Nach Zugabe von 1 ml 5% BSA-PBS und anschließendem zweimaligem Waschen folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (Alexa Fluor®488-conjugated Goat Anti-Rabbit (IgG); Alexa Fluor®488-conjugated Goat Anti-Mouse (IgG)), Verdünnung in 5% BSA-PBS 1:100, 200 µl; 4 h bei 4 °C Schwenktisch, lichtgeschützt) und ein erneutes zweimaliges Waschen.

2.2.6.3 Analytisches FACS

Bei jeder Messung wurden- als repräsentative Auswahl- möglichst 30.000 Zellen analysiert. Die Laser-Exzitation lag bei 488 nm; als Fluorochrome wurden FITC, PE und Cy3 eingesetzt; der Emissions-Spektralbereich für PI lag bei > 650 nm.

Die Zellen wurden zunächst im Vorwärts (FS)- und im Seitwärtsstreulicht (SS) ihrer Größe und Granularität entsprechend erfasst. Mit Hilfe der PI-Intensität wurde bei der extrazellulären Färbung die Fraktion lebender Zellen selektioniert („gaten“), so dass tote Zellen nicht in die Analy-

se eingingen. Diese selektionierten Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihrer CD4-Expression analysiert.

2.2.7 Magnetische Zellsortierung (MACS, Magnetic Activated Cell Sorting)

Die Methode der magnetischen Zellsortierung stellt heutzutage den Goldstandard für eine schonende Zellaufreinigung einer gewünschten Zellpopulation dar. Hierbei werden Zellen erst vereinzelt, mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenstrukturen markiert und schließlich über ein Magnetfeld separiert und aufgereinigt. Die hierbei eingesetzten Antikörper sind entweder direkt oder indirekt an kleine Magnetpartikel (sogenannte MicroBeads) gekoppelt. Beim Durchfluss über eine Säule, welche von einem starken Magnetfeld umgeben ist, werden die mit MicroBeads markierten Zellen zurückgehalten, so dass in der Säule eine reine Zellpopulation zurückbleibt. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes kann die markierte Zellpopulation aus der Säule isoliert werden und steht für weitere Versuche zur Verfügung.

Die magnetische Zellsortierung fand zu den verschiedensten Zeitpunkten der Zelldifferenzierung statt, aber wurde (wenn nicht anders angegeben) in der Regel am Tag 6 + 12 durchgeführt.

2.2.7.1 Zellvereinzelung

Vor der magnetischen Zellsortierung mussten die Zellen gewaschen und sehr sorgfältig vereinzelt werden, da die spätere Reinheit der Zellpopulation zum größten Teil von einer gründlichen Zellvereinzelung abhing. Die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen, mit PBS-EDTA (5 mM EDTA) für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mechanisch vereinzelt (mit 1000 µl-Pipette 50 mal pro Well auf- und abpipettieren, dann Überführen der gelösten Zellen in 12 ml-Röhrchen). Danach wurden die vereinezelten Zellen abermals für 15 min bei 37 °C inkubiert und mechanisch vereinzelt (mit 5 ml-Stripette und elektronischer Pipettierhilfe 50 mal auf- und abpipettieren; dann mit 2 ml-Stripette 50 mal auf- und abpipettieren). Die vereinzelteten Zellen wurden in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurde die Zellsuspension zweifach gefiltert (erst über eine zweilagige (sterile) Kompresse in ein frisches Röhrchen; im Anschluss über eine vierlagige Kompresse) und mit PBS wieder auf 50 ml aufgefüllt. Diese Zellsuspension wurde für 10 min stehen gelassen, damit sich weitere Zellaggregate absetzen konnten und schließlich in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellvereinzelung wurde zum Schluss unter einem Mikroskop kontrolliert. Bei einem zufriedenstellenden Ergebnis wurden die Zellen für die magnetische Zellsortierung eingesetzt.

2.2.7.2 Markierung mit Hilfe des indirekten Antikörpersystems

Die vereinzelt Zellen wurden zunächst mit Erstantikörpern gegen CD4 (PE-konjugiert Mouse Anti-Human CD4) markiert (Inkubation der Zellen mit 20 µl Antikörper in 100 µl MACS-Puffer für 20 min bei 4 °C). Anschließend erfolgte die Inkubation mit den an MicroBeads gekoppelten Zweitantikörpern (Anti-PE MicroBeads) (Inkubation der Zellen mit 20 µl Antikörper in 80 µl MACS-Puffer für 20 min bei 4 °C). Dieses sogenannte „indirekte Markierungssystem“ wurde ausgewählt, weil es für die Zellseparation mit dem Ziel eines möglichst hohen Reinheitsgrades besser geeignet ist als das weniger sensitive direkte Verfahren, bei dem die CD4-Antikörper direkt an MagneticBeads gekoppelt sind.

2.2.7.3 Separation mittels Mini-MACS

Von den mit Antikörpern inkubierten Zellen wurden ca. 500 µl Zellmaterial nicht für die MACS-Aufreinigung eingesetzt, um später einen Ausgangswert der CD4⁺ Zellen zu haben („Ausgangspopulation“). Die magnetische Separation wurde mit den inkubierten Zellen und Mini-MACS-Säulen entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Puffer und zur Spülung der Säulen wurde der von Miltenyi empfohlene MACS-Puffer verwendet, welcher zuvor mindestens 1 h entgast und auf Eis gekühlt worden war. Nach dem Separationsprozess wurden die positiv selektierten Zellen auf eine neue, frisch präparierte Säule gegeben und ein zweiter Selektionsschritt durchgeführt. Die so aufgereinigten Zellen („Positivfraktion“), und die in der Säule nicht gehaltenen Zellen („Negativfraktion“) wurden anschließend im FACS bezüglich des CD4⁺ Zellanteils zur Bestimmung des erfolgten Aufreinigungsgrades gemessen und für weitere Experimente eingesetzt.

2.2.7.4 Wiederausplattieren der Zellen nach magnetischer Zellsortierung

Nach MACS wurden die aufgereinigten Zellen für einige Experimente wiederausplattiert. Dabei wurden die Zellen bereits am Tag 9-12 der Differenzierung aufgereinigt, die Positivfraktion der aufgereinigten Zellen in 500 µl Differenzierungsmedium verdünnt und in vorbereitete 24-Loch-Zellkulturplatten in Differenzierungsmedium direkt wieder ausplattiert bzw. zunächst als sogenannte „Hanging Drops“ kultiviert. Nach ungefähr einer Woche konnten die wiederausplattierten und adhären Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.8 Konfokale Mikroskopie

Das Konfokalmikroskop ist eine Variante des Fluoreszenzmikroskops, mit dem virtuelle optische Schnitte durch ein Objekt erzeugt und anschließend mit einer Software zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden können.

Für die Konfokalmikroskopie wurden die EBs am Tag 6 + 6 der Differenzierung mittels MACS aufgereinigt wie unter 2.2.7.3 beschrieben. Anschließend wurden sie auf 12 mm gelatinierten Glasdeckelscheiben ausplattiert und kultiviert. Am Tag 6 + 14 erfolgten die immunhistochemischen Färbungen für Tbx5, α -Aktinin und Connexin 43, wie unter 2.2.6.2 beschrieben. Die Zellskelette wurden für Actin durch Phalloidin gegengefärbt (Inkubationszeit 30 min bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Hilfe der Glasdeckelscheiben auf Objektträger überführt, mit Mowiol eingedeckelt und im Konfokalmikroskop analysiert.

III. ERGEBNISSE

3.1 Generierung eines Vektors zur kardial-spezifischen Expression von deletiertem CD4

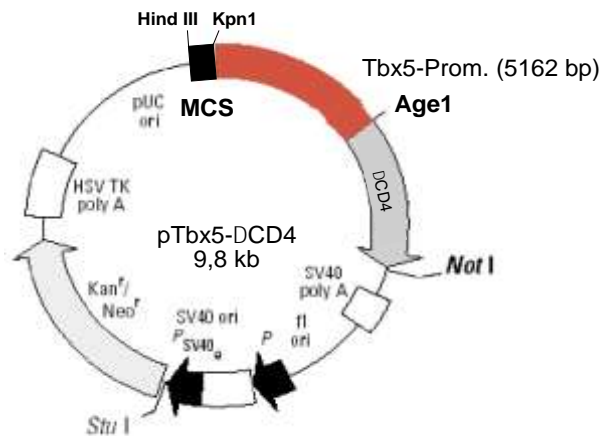


Bild III-1 Schematische Darstellung des verwendeten Vektorkonstruktes pTbx5-ΔCD4

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war ein Vektorkonstrukt pTbx5-ΔCD4 als Derivat des Vektors pΔCD4 [254] von einer Gesamtgröße von 9,8 kb kloniert worden, welches den humanen Tbx5-Promotor mit insgesamt 5162 bp und ein ΔCD4-Fragment mit insgesamt 1275 bp enthält. Der Vektor enthält außerdem unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors ein Kanamycin-Resistenzgen (Kan^r) sowie unter der Kontrolle des Simian-Virus 40 (SV40)-Promotors ein Neomycin-Resistenzgen (Neo^r), welche die antibiotische Selektion von transformierten Bakterien bzw. stabil transfizierten Zellklonen ermöglichen. In der Multiple Cloning Site sind außerdem die Schnittstellen HindIII/KpnI enthalten, welche für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen verwendet wurden (s. Bild III-1).

In diesen Vorarbeiten hatte sich jedoch gezeigt, dass mit diesem Vektor transfizierte embryonale Stammzellen zwar unter der Kontrolle des Tbx5-Promotors eine ΔCD4-Expression aufwiesen; allerdings war die relative ΔCD4-Expression zu schwach, um ΔCD4-positive Zellen mittels Magnetic Cell Sorting (s. 2.2.7) aufzureinigen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit in das bereits hergestellte Tbx5-ΔCD4-Promotorkonstrukt am 5'-Ende der Tbx5-Promotorregion ein CMV-Enhancerfragment hineinkloniert, welches dazu diente, das Promotorsignal zu verstärken, es aber dennoch spezifisch zu belassen, um dabei eine hohe und spezifische Aufreinigung mittels Magnetic Cell Sorting zu ermöglichen [250].

3.1.1 Generierung des pCMV-Tbx5-ΔCD4-Vektors

3.1.1.1 Isolierung und Klonierung des CMV-Enhancers aus dem Vektor pEGFP-N1

Der Vektor pEGFP-N1 enthält einen konstitutiv aktiven CMV-Promotor und wird zur Überexpression von Proteinen in eukaryotischen Zellen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor jedoch nur dafür verwendet, um aus der CMV-Promotorregion das CMV-Enhancerfragment zu amplifizieren. Es wurde aus dem Vektor pEGFP-N1 der CMV-Enhancer mittels „*Proof-Reading*“-PCR amplifiziert, welcher aus insgesamt 491 bp besteht. Über den „*forward*“-Primer wurde hierbei eine HindIII-Schnittstelle, über den „*reverse*“-Primer eine Kpn1-Schnittstelle eingeführt. Das amplifizierte Fragment wurde mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt und linearisiert (s. Bild III-2). Nach einem Restriktionsendonukleaseverdau mit den Enzymen HindIII und Kpn1 konnte das CMV-Enhancer-Element anschließend in den vorbestehenden Vektor (s. Bild III-1) kloniert werden.

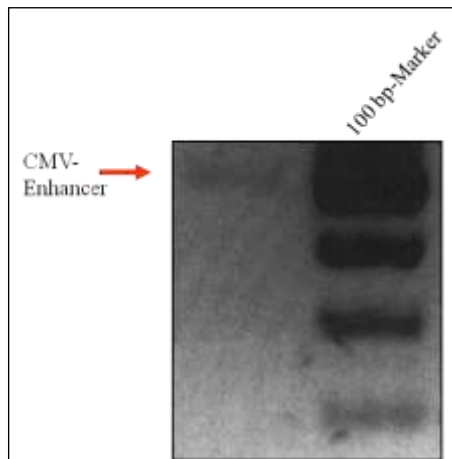


Bild III-2 Amplifiziertes CMV-Enhancer-Fragment aus dem pEGFP-N1-Vektor

Rechts: Marker 100 bp-Leiter; links: CMV-Enhancer-DNA (491bp)

3.1.1.2 Klonierung des Expressionsvektors pCMV-Tbx5-ΔCD4

Das zuvor isolierte CMV-Fragment wurde in das vorbereitete Vektorkonstrukt pTBX5-ΔCD4, welches ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und Kpn1 geöffnet worden war, inseriert (s. Bild III-3).

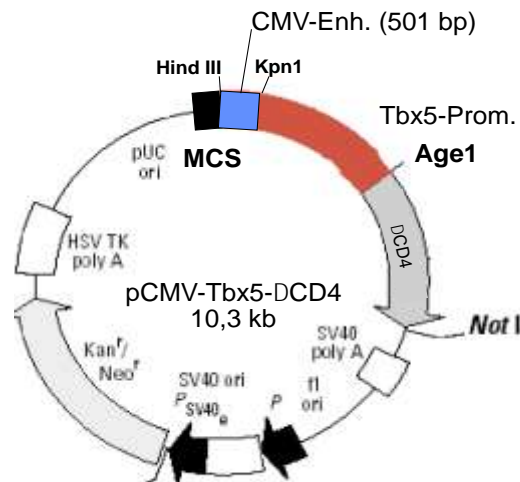


Bild III-3 Expressionskonstrukt pCMV-Tbx5-ΔCD4

Das entstandene Expressionskonstrukt wurde in kompetente TOP 10-Bakterienzellen transformiert (s. 2.2.1.2) und diese anschließend unter Kanamycin-Selektion vermehrt. Nach Präparation (s. 2.2.2.1.1) wurde das Plasmid mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.2.2.1.2.) gereinigt und nach Kontrollverdau (s. 2.2.2.2.1; Bild III-4) sequenziert (s. 2.2.2.2.6.). Das Plasmid wurde anschließend in GSES-Zellen mittels Elektroporation transfiziert (s. 2.2.5.3). Durch die Integration in das ES-Zell-Genom ermöglichte der Vektor aufgrund des Neomycin-Resistenzgens eine Antibiotika-gestützte Selektion stabil-transfizierter Zellklone und anschließend eine Expression des deletierten Oberflächenproteins CD4 (Δ CD4) unter der Kontrolle des kardialen Promotors Tbx5, dessen Signal durch den CMV-Enhancer verstärkt wurde.

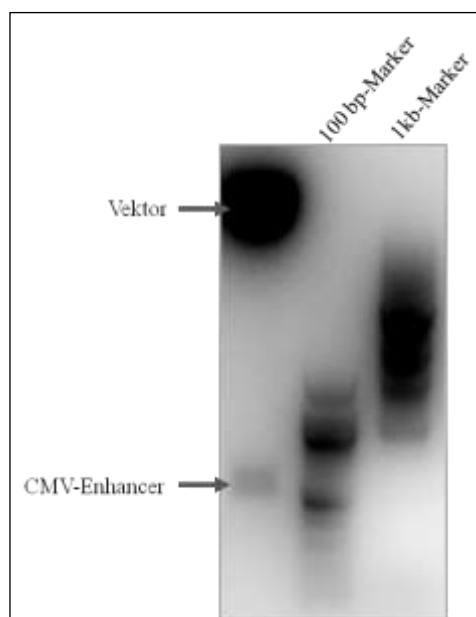


Bild III-4 Kontrollverdau nach Vektorklonierung

Rechts: Marker 1 kb, Mitte: 100 bp-Leiter, links: Vektorkonstrukt (10 kb), CMV-Enhancer-DNA (491 bp)

3.2 Generierung stabil transfizierter muriner ES-Zell-Klone mit dem Vektorkonstrukt pCMV-Tbx5-ΔCD4

Murine ES-Zellen der GSES-Linie wurden durch Elektroporation (s. 2.2.5.3) mit dem Vektor pCMV-Tbx5-ΔCD4 (s. 3.1.1) (s. Bild III-3) transfiziert. Um nur die transfizierten und Genetocin-resistenten Zellen weiter zu kultivieren, wurden die untransfizierten Zellen mit dem Eukaryontenantibiotikum G418 unter Selektionsdruck in den Zelltod getrieben (s. 2.2.5.4). Nach dem Absterben der nicht-transfizierten Zellen wurden ca. 25 Zellklone isoliert und in 24-Lochplatten vermehrt (s. 2.2.5.4). Aus diesen Zellklonen konnten mittels Antikörpermarkierung im FACS acht Klone identifiziert werden, welche während der Differenzierung eine deutliche CD4-Expression aufwiesen (s. 2.2.6.1) (s. Bild III-5). Diese wurden unter G418-Selektionsdruck vermehrt und eingefroren bzw. für die folgenden Analysen verwendet.

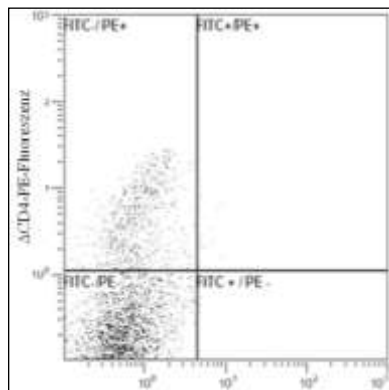


Bild III-5 Beispiel eines CD4-positiven Klons im FACS

Die positive Fraktion zeichnet sich klar als eigene Population im oberen linken Quadranten ab.

3.3 Überprüfung der Funktionalität des Expressionskonstruktes pCMV-Tbx5- Δ CD4

3.3.1 Analyse der CD4-Expression der transfizierten Zellen

Die CMV-Tbx5- Δ CD4-Klone wurden zunächst mittels FACS bezüglich ihrer Δ CD4-Expression in einem Zeitverlauf von 30 Tagen untersucht (s. 2.2.6.1), um mögliche Zeitpunkte zur magnetischen Zellaufreinigung zu evaluieren. Wie erwartet war aufgrund der fehlenden Aktivierung des Tbx5-Promotors bei ES-Zellen im undifferenzierten Zustand keine Δ CD4-Expression detektierbar. Unter Differenzierung zeigte sich jedoch in allen fünf untersuchten Klonen übereinstimmend, dass ab Tag 9 der Differenzierung eine Δ CD4-Expression nachweisbar war, welche im zeitlichen Verlauf stetig zunahm, was auch mit den in der Literatur angegebenen Expressionsmuster in der Embryonalentwicklung für Tbx5 sehr gut übereinstimmt [180]. Das Maximum der Δ CD4-Expression wurde zwischen Tag 18-21 erreicht und fiel dann bis zum Tag 30 stetig ab (s. Bild III-6).

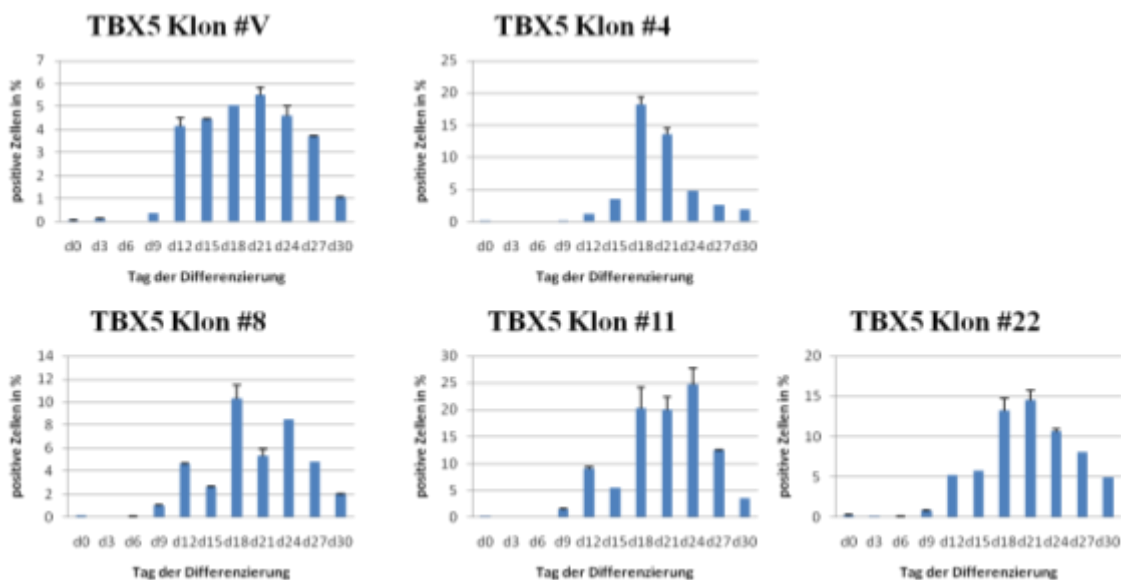


Bild III-6 Zeitliches Expressionsmuster der Δ CD4-Expression unter der Kontrolle des TBX5-Promotors in fünf verschiedenen Klonen

Die TBX5- Δ CD4-Expression beginnt am Tag 9 der Embryonalentwicklung und erreicht ihr Maximum zwischen Tag 18-21 (n=2); Error bars: StDev.

3.3.2 MACS-Aufreinigung der transfizierten Zellen

Nach der Analyse der Δ CD4-Expression im Zeitverlauf der Zelldifferenzierung wurden die transfizierten Zellen über ihr CD4-Oberflächenmolekül mittels magnetischer Zellsortierung aufgereinigt (s. 2.2.7) und im Anschluss näher charakterisiert. Dabei wurden verschiedene Zeitpunkte zur Aufreinigung der Zellen ausgewählt, bei welchen durch Voranalysen (s. 3.3.1) gewährleistet

war, dass die Zellen CD4 exprimieren und hinsichtlich Praktikabilität und möglichen Aufreinigungsgrad getestet. Die Bestätigung einer erfolgreichen Aufreinigung und Beurteilung des jeweils anteiligen Prozentsatzes der aufgereinigten Zellen erfolgten stets durch eine anschließende FACS-Analyse (s. 2.2.6.1). Dies wurde für insgesamt drei verschiedene Klone (Klon #8, Klon #11, Klon #22) zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (Tag 9, 12, 16, 18 der Differenzierung), wobei die Aufreinigung mit allen Klonen zu allen untersuchten Zeitpunkten der CD4-Expression erfolgreich war. Exemplarisch sei die folgende Aufreinigung in Bild III-7 dargestellt.

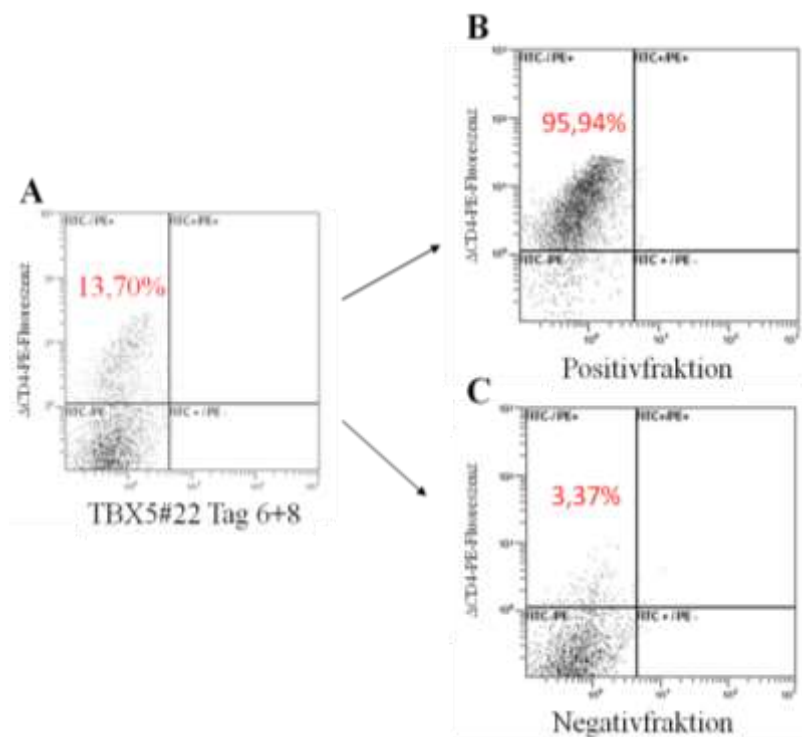


Bild III-7 MACS-Aufreinigung der CD4-PE markierten Zellen (Klon #22 am Tag 6 + 8 der Differenzierung) vor MACS (A), nach MACS-Positivselektion (B) und MACS-Negativselektion (C)

Bei einer Ausgangspopulation CD4-positiver Zellen von 13,7% (A) wurde nach Separation eine Reinheit von 95,94% (B) erzielt. In der Negativfraktion verblieben 3,37% positive Zellen (C).

Abbildung III-7 zeigt bei einer initialen Population von 13,7% positiver Zellen, die nach CD4-Antikörper-Markierung PE-Fluoreszenz aufwies, eine Anreicherung auf 95,94% CD4-positiver Zellen (bei 3,37% positiven Zellen in der Negativfraktion) durch magnetische Zellsortierung.

Darüber hinaus ließ sich durch qRT-PCR auch auf mRNA-Ebene eine starke CD4-Expression der positiven Fraktion im Vergleich zur negativen Fraktion nachweisen und bestätigte in den verschiedenen untersuchten Klonen die hohe Reinheit, die mittels MACS erzielt werden konnte (s. Bild III-8).

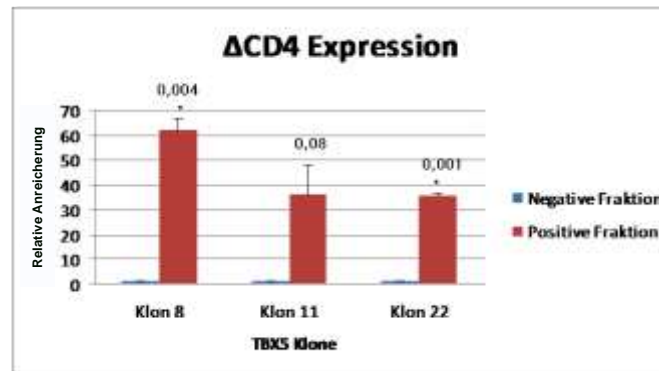


Bild III-8 CD4-Expression nach MACS-Aufreinigung der CD4-PE markierten Zellen auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR

Die starke mRNA-Expression der positiven Fraktion im Vergleich zur negativen Fraktion bestätigt die hohe Reinheit, die mittels MACS erzielt werden kann ($n = 2$; Fehlerbalken: \pm SEM).

3.3.3 Nachweis der endogen Tbx5-Expression mittels Western Blot

Am Tag 18 der Differenzierung erfolge eine magnetische Zellsortierung der transfizierten Zellen (s. 2.2.7), um anschließend jeweils die Positivfraktion, Negativfraktion und Ausgangspopulation (s. 2.2.7.3) hinsichtlich ihrer endogenen Tbx5-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot zu untersuchen.

Nach Proteinextraktion aus den Zellen (s. 2.2.4.1), anschließender Auftrennung in der SDS-PAGE (s. 2.2.4.2) und Blotten auf der PVDF-Membran (s. 2.2.4.3) erfolgte die Immunmarkierung (s. 2.2.4.4) mit Hilfe eines spezifischen murinen Tbx5-Antikörpers (s. 2.1.3). Das Molekulargewicht des murinen Tbx5-Proteins beträgt 53 kD; es zeigte sich hierbei eine starke Anreicherung des endogenen Tbx5-Proteins in der positiven Fraktion im Vergleich zur Ausgangspopulation und zur Negativfraktion (s. Bild III-9).

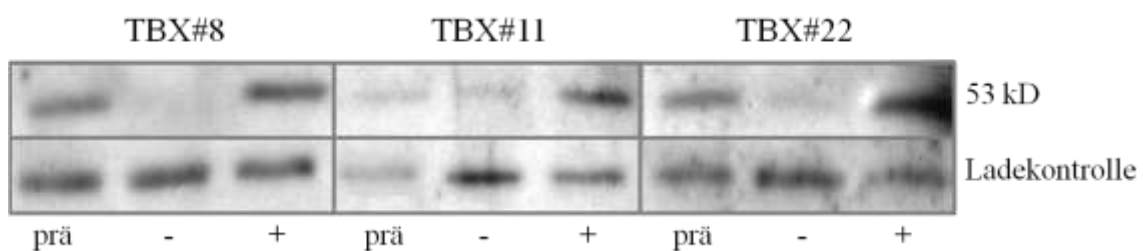


Bild III-9 Stark angereicherte endogene TBX5-Expression in der Positiv-Population im Vergleich zur Negativ- und Ausgangspopulation nach MACS

Alle drei Klone (#22, #11, #8) zeigen in der Positivfraktion (+) bei 53 kD eine starke, spezifische Markierung durch Anti-Tbx5-Antikörper im Vergleich zur Ausgangspopulation (prä), während die Negativfraktion (-) an Tbx5-Protein abgereichert ist.

3.3.4 Nachweis der endogenen Tbx5-Expression mit immunhistochemischen Färbungen in der konfokalen Mikroskopie

Da sichergestellt werden sollte, dass die Zellen nach erfolgter MACS-Aufreinigung und unter Annahme der Funktionalität des Vektorkonstruktes eine hohe und gleichmäßig verteilte endogene Tbx5-Expression aufwiesen, wurden die Zellen mit immunhistochemischen Färbungen in der konfokalen Mikroskopie bezüglich ihrer Tbx5-Lokalisation und -Verteilung untersucht. Hierfür wurden die Zellen am Tag 12 der Differenzierung über ihr Oberflächenprotein CD4 mittels MACS aufgereinigt (s. 2.2.7), die Positivfraktion der Zellen wiederausplattiert (s. 2.2.7.4) und anschließend am Tag 20 der Differenzierung intrazellulär mit einem Tbx5-Antikörper markiert (s. 2.2.6.2), wobei die Zellskelette für Actin durch Phalloidin gegengefärbt wurden (s. 2.2.8). Phalloidin ist ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amantia phalloides*) und hat eine hohe Affinität zu F-Actin. Dadurch markiert an Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin wie ein Antikörper zelluläres F-Actin und kann damit das Zytoskelett von Zellen sichtbar machen [262, 263], (s. Bild III-10, B und C).

Anhand dieser Färbungen konnte Tbx5 in allen Zellen der Positivfraktion als nukleäres Protein nachgewiesen werden, wie es für diesen Transkriptionsfaktor beschrieben worden ist [182], (s. Bild III-10, A und C).

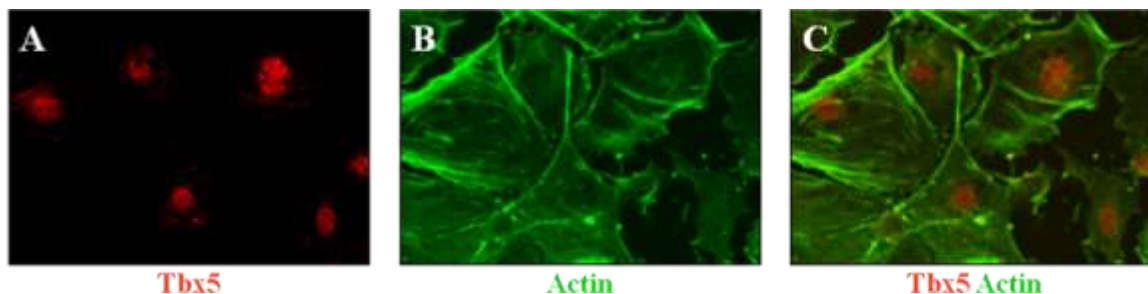


Bild III-10 Endogene Tbx5-Expression der aufgereinigten und wiederausplattierten Zellen am Tag 20 der Differenzierung im konfokalen Mikroskop mit immunhistochemischen Färbungen

A: Tbx5 (rot), B: Gegenfärbung Actin (grün), C: Überlagerung Tbx5 und Actin

3.4 Charakterisierung der aufgereinigten Zellen

3.4.1 Genexpressionsanalyse der Zellklone auf mRNA-Ebene

Da die aufgereinigten Zellen nachweislich eine endogene Tbx5-Expression zeigten, welche auf eine kardiale Identität der aufgereinigten Zellen hinwies, wurde eine Expressionsanalyse der Zellen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR hinsichtlich kardialer Marker durchgeführt (s. 2.2.2.3.2). Die Zellen wurden dabei zunächst mittels MACS aufgereinigt (s. 2.2.7), die mRNA jeweils aus der Positivfraktion und der Negativfraktion der Zellen isoliert (s. 2.2.3.1), in cDNA umgeschrieben (s. 2.2.3.2) und mit teilquantitativer Real-Time-PCR bezüglich ihrer jeweiligen Expressionsstärke untersucht (s. 2.2.2.3.2). Die Genexpressionsanalyse wurde an jeweils drei voneinander unabhängigen Klonen zweifach durchgeführt, wobei die quantitative mRNA-Expression der Ausgangsfraction jeweils auf 1 normiert wurde. Anschließend wurde das Verhältnis der mRNA-Fraction der Positivfraktion mit dem der Negativfraktion verglichen.

3.4.1.1 Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich direkter Zielgene von Tbx5

Der Transkriptionsfaktor Tbx5 besitzt als wichtigste bekannte direkte Zielgene Connexin 40 und ANF [159, 164, 167, 193], so dass zu erwarten war, dass bei einer verstärkten Aktivität von Tbx5 auch diese Zielgene stärker aktiv sein würden.

Es wurden daher qRT-PCRs für diese Zielgene am Tag 12 der Differenzierung mit dem in 3.4.1 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Im Vergleich der Mittelwerte zeigte sich eine deutliche und signifikante Anreicherung in der Positivfraktion im Vergleich zur Negativfraktion (s. Bild III-11) hinsichtlich Connexin 40 (17fach) und ANF (dreifach).

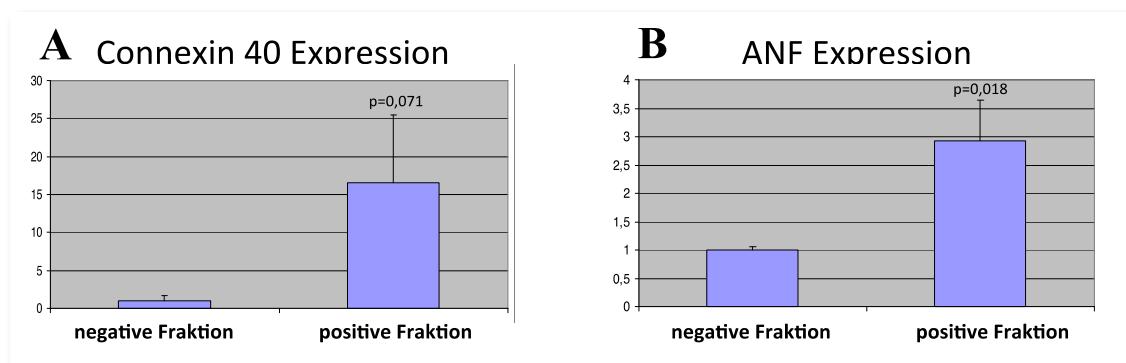


Bild III-11 Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich direkter Zielgene von Tbx5

Connexin 40 (A) ist in der Positivfraktion im Vergleich zur Negativfraktion 17fach angereichert ($p = 0,071$), ANF (B) ist in der Positivfraktion im Vergleich zur Negativfraktion dreifach angereichert ($p = 0,018$) ($n = 6$; Fehlerbalken: \pm SEM).

3.4.1.2 Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich ihrer ventrikulären Spezifität

Die Untersuchung weiterer wichtiger kardialer Gene, darunter Connexin 43, welches während der Embryonalentwicklung kammerspezifisch ist [166, 264] und Nkx2.5, welches eine wichtige Rolle in der ventrikulären Herzentwicklung einnimmt [265], zeigte ebenfalls eine verstärkte und signifikante mRNA-Expression in der Positivfraktion der aufgereinigten Zellen im Vergleich zur Negativfraktion (s. Bild III-12).

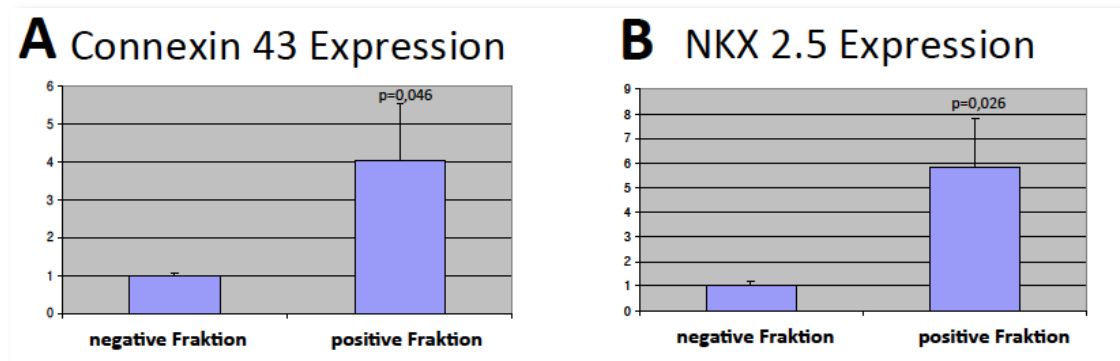


Bild III-12 Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich ihrer ventrikulären Spezifität

Connexin 43 (A) ist in der Positivfraktion im Vergleich zur Negativfraktion vierfach angereichert ($p = 0,046$); Nkx2.5 (B) ist sechsfach angereichert ($p = 0,026$) ($n = 6$; Fehlerbalken: \pm SEM).

3.4.1.3 Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich Tbx5-beeinflussender Transkriptionsfaktoren

Weitere wichtige kardiale Transkriptionsfaktoren, die einen Einfluss auf Tbx5 haben, sind Gata4- als Kofaktor von Tbx5 [165]- und Tbx20, welches einen indirekter Aktivator von Tbx5 darstellt [159]. Für diese Transkriptionsfaktoren zeigten sich in qRT-PCRs aufgereinigter Zellen ebenfalls eine starke und signifikante Anreicherung der jeweils kodierenden mRNA von Tbx20 und Gata4 (s. Bild III-13).

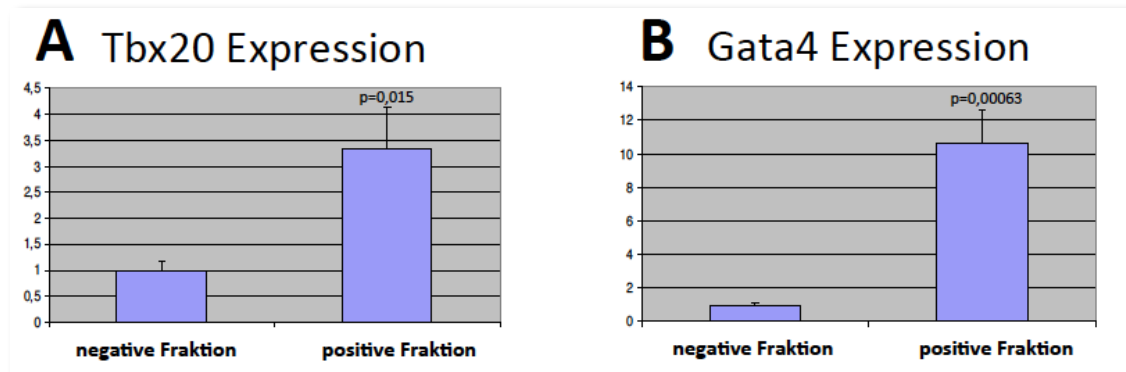


Bild III-13 Quantitative RT-PCRs der aufgereinigten Zellen hinsichtlich Tbx5-beeinflussender Transkriptionsfaktoren

Tbx20 (A) ist dreifach ($p = 0,015$), Gata4 (B) ist zehnfach ($p = 0,00063$) in der Positivfraktion im Vergleich zur Negativfraktion angereichert ($n = 6$; Fehlerbalken: \pm SEM).

3.4.2 Nachweis normaler Sarkomermuster und interzellulärer Verbindungen der Tbx5-Klone mit immunhistochemischen Färbungen in der konfokalen Mikroskopie

Nach Aufreinigung (s. 2.2.7) und Wiederausplattieren der Tbx5-Zellklone (s. 2.2.7.4) zeigten die Zellen nach immunhistochemischen Färbungen (s. 2.2.8) in der Konfokalmikroskopie normale Strukturen des sarkomerischen Markers α -Aktinin (s. Bild III-14). A-Aktinin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 90-103 kDa, welches in Sarkomeren Aktinfilamente auf Höhe der Z-Scheibe verbindet. Es wurden dabei sarkomerische Isoformen (α -Aktinin-2 und α -Aktinin-3), eine nicht sarkomerische Isoform für glatte Muskulatur (α -Aktinin-1) und auch eine nicht muskuläre Isoform (α -Aktinin-4) beschrieben [266]. Der hier verwendete sarkomerische Antikörper bindet an skelettales und kardiales Muskel- α -Aktinin.

In immunhistochemischen Färbungen hinsichtlich Connexin 43 zeigten sich normale interzelluläre Verbindungen (s. Bild III-14). Connexine sind Transmembranproteine mit einer Größe von 23-62 kDa, die die interzellulären „Gap Junctions“ bilden und damit den Austausch wasserlöslicher Stoffe zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Es sind bisher 21 humane sowie 20 murine Connexine bekannt [267]. Das am häufigsten vorkommende, während der Embryonal-

entwicklung ventrikelspezifische Connexin 43 [166, 264, 268] bildet den Hauptanteil der kardialen Connexine und hat eine essentielle modulierende Rolle in der elektrischen Aktivität [269].

Diese Befunde sprechen dafür, dass sich die genetisch manipulierten, aufgereinigten und wieder ausplattierten ES-Zellen zu normalen ventrikulären Kardiomyozyten entwickelten.

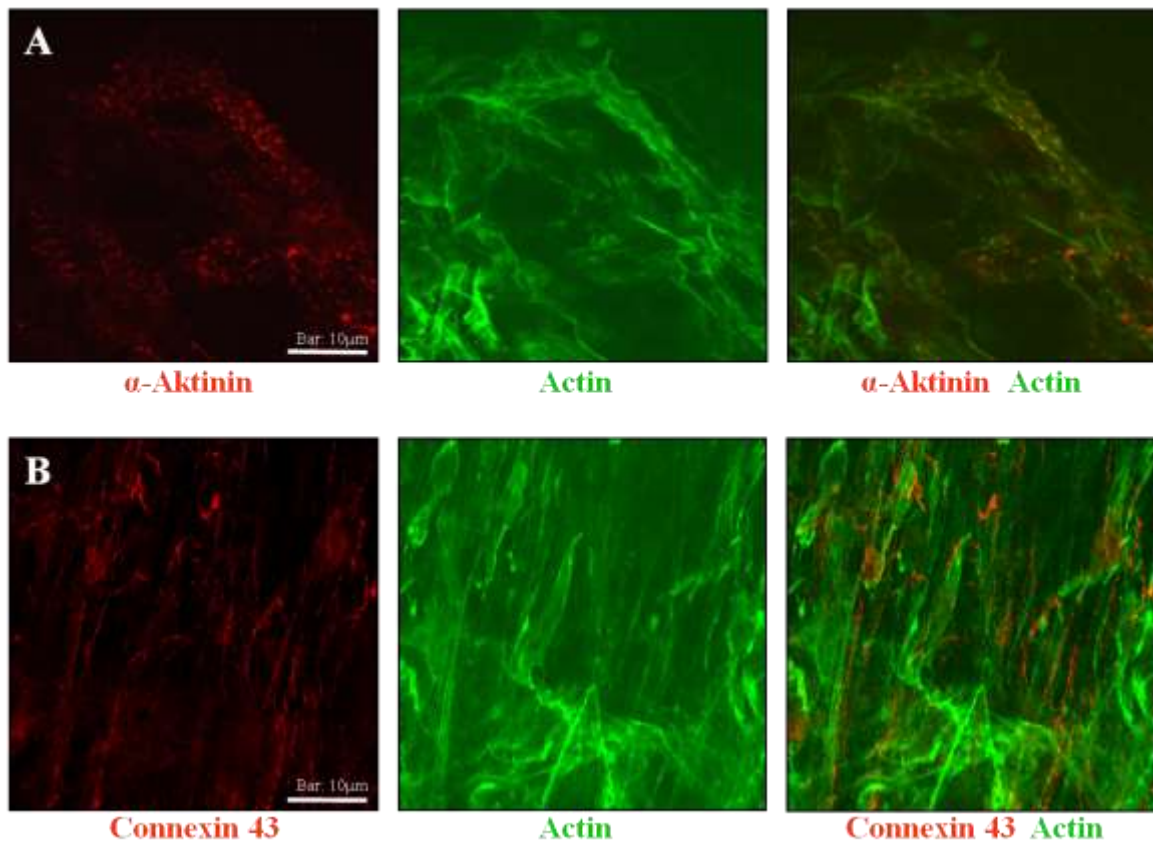


Bild III-14 Nachweis normaler subzellulärer sarkomerischer Strukturen und interzelluläre Verbindungen der aufgereinigten und wiederausplattierten Tbx5-Zellklone in der fokalen Mikroskopie mit immunhistochemischen Färbungen

A: α -Aktinin (rot), Gegenfärbung Actin (grün), Überlagerung α -Aktinin und Actin

B: Connexin 43 (rot), Gegenfärbung Actin (grün), Überlagerung Connexin 43 und Actin

3.4.3 Nachweis normaler elektrophysiologischer Aktivität der aufgereinigten Kardiomyozyten

Nach dem Wiederausplattieren der Zellen nach magnetischer Zellsortierung und deren Kultivierung als „*Hanging Drops*“ (s. 2.2.7.4) konnten nach einigen Tagen spontan schlagende Zella-reale beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob diese schlagenden Zellen tatsächlich typische Eigenschaften sich entwickelnder Kardiomyozyten hatten, wurden erste elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Von 2 Einzelzellen, die aus einem schlagenden Areal isoliert wurden, gelang es, stabile spontane Aktionspotentiale abzuleiten (s. Bild III-15).

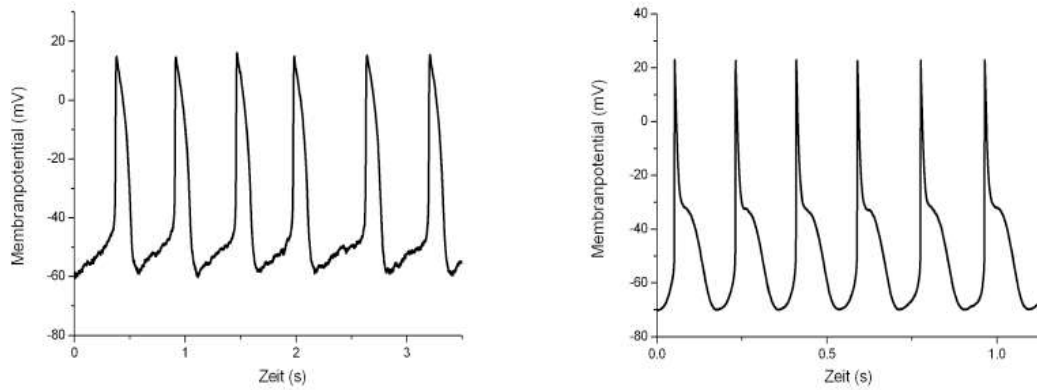


Bild III-15 Spontane Aktionspotentiale aus isolierten Einzelzellen

Die Aktionspotentiale waren dabei zwar etwas unterschiedlich in ihrer Form, beide stellen jedoch typische, adäquat differenzierte myokardiale Aktionspotentiale im Embryonalstadium mit einem maximalen diastolischen Potential (MDP) von -60 bis -70 mV dar. Zusätzlich weisen beide eine (unterschiedlich ausgeprägten) Plateauphase auf, die dem Einstrom von Calciumionen entspricht, was Voraussetzung einer Zellkontraktion ist. Dies bestätigte die unveränderten physiologischen Eigenschaften der aufgereinigten myokardialen Zellen.

IV. DISKUSSION

4.1 Regenerative Medizin als neuer Behandlungsansatz kardiovaskulärer Erkrankungen

Regenerative Medizin hat das Ziel defektes oder zerstörtes Gewebe durch Stimulation endogener Zellen wiederherzustellen oder es durch Transplantation von gesundem Gewebe oder einzelner Zellen zu ersetzen [270].

Die Idee von sich vollständig regenerierenden Organen ist ein Traum der Menschheit seit tausenden von Jahren. Bereits bei den alten Griechen existierte in der Mythologie die Geschichte vom Titanen Prometheus. Dieser hatte den Menschen verbotenerweise das Feuer gebracht, wird dafür als göttliche Strafe an einen Felsen gekettet und muss sich jeden Tag von einem Adler seine Leber auffressen lassen. Prometheus überlebt diesen Prozess jedoch stets, da die Leber sich selbst täglich neu zu ersetzen vermag. Diese alte Idee könnte mit Hilfe der regenerativen Medizin Wirklichkeit werden.

Durch die kontinuierlichen Fortschritte der Stammzellforschung hat die regenerative Medizin eine große Entwicklung durchlaufen, welche insbesondere auf dem Gebiet der kardiovaskulären Erkrankungen völlig neue Forschungs- und Therapieansätze ermöglicht.

1963 wurde erstmalig das Potential von Progenitorzellen aus dem Knochenmark- auch als adulte Stammzellen bezeichnet- erkannt [271]. Seither gab es in der Kardiologie viele Forschungsarbeiten, die sich beispielweise mit der Frage einer verbesserten kardialen Pumpfunktion nach einem Myokardinfarkt durch die Transplantation adulter Progenitorzellen auseinandergesetzt haben [272, 273]. Trotz zunächst ermutigender Ergebnisse zeigten sich jedoch im Laufe der Jahre keine überzeugenden Daten hinsichtlich einer „*de novo*“ Kardiomyogenese aus den sogenannten adulten Stammzelltypen [272, 274].

Eine der großen Meilensteine in der Stammzellforschung war daher die erfolgreiche Isolation und Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen in den frühen 1980ern [51, 52]. Diese neuen Zellen waren erstmalig nicht von Tumorzellen abstammende, immortale Zellen mit selbsterneuernden und pluripotenten Eigenschaften und hatten damit das Potential, sich in alle Zellabkömmlinge des menschlichen Körpers zu differenzieren. Sie führen somit nicht nur in der Stammzellbiologie, sondern auch auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie, der Genetik und der regenerativen Medizin zur Einleitung einer neuen Ära.

Es dauerte jedoch 20 Jahre, bis ein weiterer großer Durchbruch in der Stammzellforschung erfolgte: die Isolierung und Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen durch Thomson et al. [54]. Dennoch zeigte sich bald, dass eine klinische Anwendung dieser Forschungsansätze

sehr schwierig und langwierig werden würde: erst nach über einem Jahrzehnt humaner Stammzellforschung wurde 2009 die erste Patientenstudie von der FDA genehmigt, welche humane pluripotente embryonale Stammzellen am Patienten einsetzt. Diese Studie, welche sich an Patienten mit Rückenmarksverletzungen richtete und im Oktober 2010 den ersten Patienten einschließen konnte, wurde durch die Firma Geron initiiert [275]. Überraschenderweise wurde diese Studie jedoch im Verlauf abgebrochen. Zusätzlich kündigte Geron an, dass alle anderen Aktivitäten auf dem Gebiet der humanen Stammzellforschung eingestellt werden würden. Zum aktuellen Zeitpunkt führt lediglich die Firma Advanced Cell Technology eine weitere Patientenstudie mit humanen embryonalen Stammzellen durch; im Rahmen dieser Studie werden Patienten mit ausgeprägter Makuladegeneration am Rande zur Blindheit Netzhautzellen transplantiert, welche von humanen Stammzellen abstammen. Endgültige Ergebnisse werden jedoch nicht vor Ende 2013 vorliegen und sie werden auch lediglich die Frage beantworten können, ob die durchgeführten Zelltransplantationen grundsätzlich sicher sind [276].

Auf dem Gebiet der kardialen Stammzellforschung ist man zum aktuellen Zeitpunkt von Patientenstudien mit Herzmuskelzelltransplantationen aus humanen embryonalen Stammzellen noch weit entfernt.

Die frühesten Versuche pluripotente Stammzellen für eine myokardiale Regeneration zu verwenden bestanden darin, im Rahmen von Tiermodellen undifferenzierte embryonale Stammzellen in infarzierte Herzen zu injizieren [200, 277, 278]. Auch wenn dabei die Experimente teilweise eine verbesserte kardiale Pumpfunktion nahelegten, wäre dieser Ansatz dennoch nicht für eine klinische Anwendung am Menschen geeignet: es konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von undifferenzierten Stammzellen zu Teratombildung im Herzen führen kann [217, 279]. Eine mögliche Strategie, die Teratogenität der Zellen zu eliminieren, wäre eine „Prädifferentizierung“ von Stammzellen vor einer Transplantation, so dass sie hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials bereits auf definierte funktionelle Zelltypen beschränkt sind [205]. Dennoch sollten die transplantierten Zellen in der Lage sein, sich in das Empfängergewebe zu integrieren und funktional und elektromechanisch zu koppeln, um keine Arrhythmien entstehen zu lassen [11, 280].

Auch hinsichtlich immunologischer Bedenken ist die Stammzelltransplantation beim Menschen schwierig: allogene Zellen bergen nach der Transplantation das Risiko einer Immunabstoßung (vgl. 1.6.1), so dass eine langfristige Immunsuppression nach einer Transplantation mit all den Nebenwirkungen einer dauerhaften Immunsuppression vonnöten sein würde.

Auch aus ethischen und rechtlichen Gründen ist die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen oder deren klinischen Anwendung aufgrund der Art ihrer Gewinnung sehr umstritten und schwierig und bis zum heutigen Tage einer andauernden ethischen Debatte ausgesetzt.

Nach wie vor bedarf es zur Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen der Zerstörung von frühen menschlichen Embryonen.

Es ist in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz verboten, menschliche Embryonen (bzw. Blastozysten) für Forschungszwecke herzustellen, zu klonen oder zu zerstören; unter Auflagen ist es jedoch möglich, an importierten humanen ES-Zellen zu forschen. Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen wurde zunächst durch das Stammzellgesetz vom Juli 2002 geregelt. Nach der sogenannten Stichtagsregelung durften nur humane ES-Zellen nach Deutschland importiert werden, die vor dem 1. Januar 2002 gewonnen worden sind.

Am 11. April 2008 wurde vom Deutschen Bundestag ein neuer Stichtag bestimmt, so dass heute Stammzellen importiert werden dürfen, die vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden [281]. Insgesamt ist die Stichtagsregelung jedoch sehr umstritten und eine langfristige und endgültige Regelung konnte jedoch bis zum heutigen Tage nicht geschaffen werden.

Es zeigt sich derzeit nach über 30 Jahren Stammzellforschung, dass eine Anwendung am Menschen sehr schwierig ist und insbesondere das Gebiet der kardiovaskulären Regeneration noch weit von einer routinemäßigen klinischen Anwendung entfernt ist.

Die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche und langfristig zufriedenstellende Transplantation von kardialen Zellen aus embryonalen Stammzellen ist das Vorliegen einer optimalen Zelltyps, der die oben genannten Schwierigkeiten überwinden kann. Eine ideal zu transplantierende Zelle wäre demnach eine sich selbst-erneuernde Zelle, welche die Zelltransplantation unbeschadet überstehen würde, sich im Herzen als kardiale Zelle integrieren und dabei die Patientensicherheit durch teratogenes, arrhythmogenes oder immunogenes Potential nicht gefährden würde [29]. Hierbei wäre die Balance zwischen der Vermehrungs- und Anpassungsfähigkeit der Zellen und der Verlässlichkeit ihrer Differenzierung zum angestrebten Zelltyp ausschlaggebend für den Erfolg und die Sicherheit einer potentiellen klinischen Anwendung [282]. In der Zellkultur eventuell nicht ausreichend differenzierte Zellen könnten sich nach einer Übertragung in den menschlichen Körper unkontrolliert vermehren und so zu Teratomen oder anderen Zellwucherungen führen; zu weit differenzierte Zellen könnten das Potential verloren haben, sich funktional in ein myokardiales Gewebe zu integrieren. Somit sollten vor einer klinischen Anwendung am Menschen- modifiziert nach Hescheler et al.- zusammenfassend optimalerweise folgende Kriterien in der Zellkultur und im Tiermodell erfüllt sein [282]:

1. Das Vorliegen geeigneter kardialer Vorläuferzellen in ausreichender Anzahl und Reinheit
2. Eine kontrollierte Vermehrung der Zellen zu standardisierten Zellkulturbedingungen

3. Die Ausdifferenzierung der transplantierten Zellen in funktionstüchtige adulte Kardiomyozyten
4. Das Überleben und Anwachsen der transplantierten Zellen im Empfängermyokard ohne immunogene Reaktionen oder der Notwendigkeit einer dauerhaften Immunsuppression
5. Die physiologische Integration der Zellen mit elektrophysiologischer Kopplung im Empfängermyokard ohne Teratombildung oder Verursachung von Arrhythmien
6. Die Verwendung eines ethisch unbedenklichen Zelltyps

Die ersten drei genannten Punkte legen hierbei den Grundbaustein für die Durchführung von erfolgreichen Transplantationsstudien, beispielweise im Mausmodell, um so letztlich eine langfristige Anwendung am Menschen zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit widmete sich daher besonders diesen drei Punkten, um zu optimalen Voraussetzungen einer langfristig erfolgreichen kardialen Stammzellforschung beizutragen.

Es gilt jedoch auf lange Sicht, all die genannten Punkte zu lösen, da von der Erfüllung dieser Kriterien eine ethisch vertretbare Anwendung am Menschen abhängig sein wird. Eine der großen Herausforderungen der Stammzellforschung wird es in den nächsten Jahren also sein, diesbezüglich zufriedenstellende Lösungen bieten zu können.

4.2 Magnetische Zellaufreinigung kardialer Vorläuferzellen mit Hilfe des CMV-TBX5- Δ CD4-Vektorkonstruktes

Die wesentliche Grundvoraussetzung einer erfolgreichen Transplantation kardialer Vorläuferzellen ist das Vorliegen einer entsprechenden Ausbeute und Reinheit von Herzmuskelzellen, welche mit einer herkömmlichen ES-Zell-Kultur bei einem Kardiomyozytenanteil von 1-10% nicht gewährleistet werden kann [11, 198].

Es existieren inzwischen bereits viele verschiedene Methoden, um die Ausgangspopulation von kardialen Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen zu erhöhen oder Kardiomyozyten aus Mischpopulationen herauszufiltern, doch diese Verfahren scheitern häufig an ihrer Effizienz oder dem zellschädigenden Procedere.

In der Stammzellforschung gab es daher sehr früh die Idee, über ein zelluläres Oberflächenprotein kardiale Vorläuferzellen aufzureinigen [283, 284], jedoch war das Hauptproblem, dass kein endogener spezifischer Oberflächenmarker kardialer Vorläuferzellen bekannt ist [19, 237, 249].

Das von David et al. 2005 entwickelte Verfahren, welches mittels magnetischer Zellsortierung über den stabil transfizierten Oberflächenmarker Δ CD4 embryonale Stammzellen zellschonend aufzureinigen vermag (s. 1.7.2), wurde aufgrund der in 1.7.2 erläuterten Vorteile in dieser Arbeit verwendet und speziell auf den Tbx5-Promotor übertragen, um somit kardiale Vorläuferzellen spezifisch aufzureinigen (s. 1.8). Da Tbx5 ein hochkonservierter Transkriptionsfaktor für die Kardiogenese ist, wurde für einen spezifischen Nachweis in der murinen ES-Zellkultur ein humaner Tbx5-Promotor (TBX5) verwendet, was auch eine spätere Übertragung des Konstruktes auf ein humanes Zellsystem erleichtern würde.

Um einen effizienten Zellaufreinigungsprozess mit Hilfe einer starken Oberflächenmarkerexpression zu erleichtern, wurde das Vektorkonstrukt TBX5- Δ CD4 mit einem CMV-Enhancerelement ergänzt, welches dazu diente, das Promotorsignal zu verstärken, aber trotzdem spezifisch zu belassen. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enhancerelement wurde bereits von Müller et al. erfolgreich eingesetzt. In der Arbeit von Müller et al. konnte gezeigt werden, dass ventrikuläre Zellen unter der Kontrolle des MLC2v-Promotors mit Hilfe eines CMV-Enhancerelementes hoch aufgereinigt werden können, ohne dabei die Gewebespezifität zu verändern [250].

Die Entscheidung für Tbx5 als kardialen Promotor wurde aus mehreren Gründen getroffen: zunächst existiert eine bereits sehr ausführliche, gute Charakterisierung hinsichtlich der Funktion, Wirkung und der Zielgene von Tbx5, so dass die Spezifität des Vektorkonstruktes gut überprüft werden konnte. Das wichtigste Kriterium war jedoch der Zeitpunkt von Tbx5 in der Kardiogenese: Tbx5 wird von kardialen Vorläuferzellen exprimiert, so dass eine Selektion von Tbx5-

exprimierenden Zellen zu einer Zellpopulation führen sollte, welche in der Kardiogenese bereits relativ weit entwickelt sein würde und damit kein hohes Risiko hinsichtlich Teratombildung oder Transdifferenzierung in andere Gewebearten darstellen würde. Auf der anderen Seite sollten die Zellen einer solchen Zellpopulation noch undifferenziert genug sein, um genügend Plastizität für eine Integration in ein Empfängermyokard und eine elektromechanische Koppelung aufzuweisen. Diese Aspekte waren insbesondere in Hinblick auf eine Verwendung der Zellen im Tiermodell und eine spätere Anwendung am Patienten bedacht worden.

4.2.1 Spezifische Aufreinigung embryonaler Stammzellen unter der Verwendung eines kardialen Promotorkonstruktes mittels magnetischer Zellsortierung

Nach der Generierung eines Tbx5-Promotorkonstruktes (s. 3.1.1) und stabiler Transfektion in undifferenzierte, murine ES-Zellen (s. 3.2) konnte in FACS-Analysen in fünf unabhängigen Klonen eine Δ CD4-Expression verzeichnet werden. Diese wies dabei ein Expressionsmuster auf, das sich analog zu dem in der Literatur angegebenen Expressionsmuster embryonaler Tbx5-Expression verhielt [178].

Es erfolgte eine Aufreinigung mit Hilfe magnetischer Zellsortierung über das Δ CD4-Oberflächenprotein. Dabei konnten mit allen verwendeten Zellklonen zu verschiedenen Zeitpunkten Reinheiten von über 95% Δ CD4-positiver Zellen erzielt werden. Dies ließ sich nicht nur auf mRNA-Ebene mit Hilfe von qRT-PCR, sondern auch auf Proteinebene mittels FACS bestätigen.

Die mögliche Aufreinigung zu verschiedensten Zeitpunkten sowie der hohe Reinheitsgrad der Zellen mit allen verwendeten Zellklonen zeigt insbesondere die Reproduzierbarkeit und die Praktikabilität des Verfahrens, welches in herkömmlichen Aufreinigungsverfahren kardialer Zellen in der Regel nicht gegeben ist.

4.2.2 Überprüfung der kardialen Eigenschaften der aufgereinigten Zellen

Im transfizierten Konstrukt stand die Expression des Oberflächenproteins Δ CD4 unter der Kontrolle des CMV-TBX5-Promotors. Somit war bei einer endogenen Expression von Tbx5 die gleichzeitige Aktivierung des CMV-TBX5-Promotors- und damit die Expression von Δ CD4 zu erwarten. Umgekehrt sollte im Idealfall gelten, dass bei einer detektierbaren (und aufreinigbaren) CD4-Expression der Zellen eine hohe endogene Expression von Tbx5 vorlag. Die Zellen, welche CD4 exprimierten, sollten demnach eine hohe endogene Expression von Tbx5 aufweisen, während in den Zellen, welche kein CD4 exprimieren, keine oder eine nur sehr geringe Expression von Tbx5 nachweisbar sein sollte. Dieser Beweis wurde auf Proteinebene mittels Western Blot bei drei verschiedenen Klonen erbracht: eine Untersuchung der aufgereinigten Zellen

auf Proteinebene hinsichtlich der endogenen Tbx5-Expression ergab, dass die Zellfraktion, die mittels MACS als CD4-positiv aufgereinigt worden war, eine massiv höhere endogene Tbx5-Expression aufwies im Vergleich zu den Zellen vor der Aufreinigung. Die Negativzellfraktion zeigte im Vergleich zur Ausgangspopulation keine oder eine allenfalls nur sehr geringe Tbx5-Expression.

Durch diesen Nachweis konnte gezeigt werden, dass sich bei einer detektierbaren CD4-Expression in den transfizierten Zellen auf eine gleichzeitige endogene Tbx5-Expression rückschließen lässt und bildete damit die Grundlage dieser Arbeit. Darüber hinaus wurde die Funktionalität und Spezifität des Promotorkonstruktes bestätigt.

In immunhistochemischen Färbungen der über das Oberflächenprotein CD4 aufgereinigten und anschließend wiederausplattierten Zellen zeigte sich außerdem eine gleichmäßige Verteilung der Tbx5-Expression in allen Zellkernen, was neben der erneuten Bestätigung der Konstruktspezifität auch das normale Expressionsmuster aller positiv aufgereinigten Zellen belegte. Hierbei zeigte sich, dass die hohe endogene Tbx5-Expression nicht auf der ausgeprägten Expression einiger weniger aufgereinigter Zellen, sondern vielmehr auf einer ungefähr gleichmäßig verteilten Expression aller aufgereinigten Zellen beruhte, welches die hohe Anreicherung im Western-Blot-Experiment bestätigte.

Eine weiterführende Charakterisierung der aufgereinigten Zellen auf mRNA-Ebene konnte zeigen, dass die direkten Zielgene von Tbx5- Connexin 40 und ANF [164, 167]- eine verstärkte Expression in den aufgereinigten Zellen aufwiesen. Darüber hinaus sind Connexin 40 und ANF während der Embryonalentwicklung spezifisch für Ventrikelmuskard [166, 264, 268], so dass sich damit auch indirekt auf eine verstärkte Kammerentwicklung der aufgereinigten Zellen rückschließen ließ. Darüber hinaus scheint ANP insbesondere im linken Ventrikel stark exprimiert zu werden [160]. Die Untersuchungen weiterer wichtiger kardialer Gene- darunter Connexin 43, welches während der Embryonalentwicklung kammerspezifisch ist [166, 264, 268] und Nkx2.5, welches eine wichtige Rolle in der ventrikulären Herzentwicklung einnimmt [265]- konnten ebenfalls eine verstärkte Aktivität in der Positivfraktion der aufgereinigten Zellen nachweisen, was weitere Hinweise auf eine erhöhte Ausbeute von Zellen des ventrikulären Typs liefert. Da bei großen kardialen Zellschädigungen- beispielsweise im Rahmen eines Herzinfarktes- insbesondere linksventrikuläre Zellen betroffen sind, war eine hohe Aufreinigung von ventrikulären- bzw. linksventrikulären Zellen besonders wünschenswert und macht damit diese spezielle Aufreinigung für eine klinische Anwendung sehr attraktiv.

Darüber hinaus ließ sich auch bei weiteren wichtigen kardialen Markern wie Gata4 und Tbx20 eine deutliche Anreicherung der jeweiligen mRNA in den aufgereinigten Zellen nachweisen.

Mit Gata4 als wichtigem Cofaktor von Tbx5 sowie Tbx20 als indirekten Aktivator von Tbx5 wurde zudem die Funktionalität des Vektorkonstruktes erneut deutlich gemacht.

Weiterführende immunhistochemische Färbungen konnten bei den aufgereinigten und wieder-
ausplattierten Zellen bezüglich der zellulären Morphologie außerdem normale Sarkomerstruktu-
ren und intrazelluläre Verbindungen nachweisen. Dies zeigte die normale kardiale Entwicklung
und elektromechanische Koppelung der Zellen auf.

Im weiteren zeitlichen Verlauf konnte zudem eine erneute Kontraktionsaktivität der aufgereinig-
ten und wiederausplattierten Zellen beobachtet werden; zusätzlich zeigten sich in ersten elektro-
physiologischen Untersuchungen typische und adäquat differenzierte embryonale Aktionspoten-
tiale mit einer Plateauphase, was die Vitalität und die kardiale Entwicklung der aufgereinigten
Zellen bewies und die Sanftheit des Aufreinigungsverfahrens bestätigte.

Zusammenfassend zeigten sich in der Zellcharakterisierung nicht nur die Spezifität des Kon-
struktes, sondern auch unveränderte Eigenschaften kardialer Vorläuferzellen, welche auf
mRNA-Ebene, Proteinebene, morphologisch und funktionell nachgewiesen werden konnten.
Somit stellt das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte CMV-TBX5- Δ CD4-Expressionskonstrukt
und das verwendete Konzept der magnetischen Zellaufreinigung über ein CD4-
Oberflächenprotein einen idealen Ansatz für eine hochspezifische Aufreinigung kardialer Vor-
läuferzellen zur Zelltransplantation dar. Insbesondere hat das dargestellte Verfahren gegenüber
anderen herkömmlichen Aufreinigungsverfahren- wie unter 1.7 beschrieben- den Vorteil, dass
hier eine besonders hohe Reinheit von kardialen Vorläuferzellen erzielt werden konnte, welche
nicht nur durch die Einfachheit und Schnelligkeit des Verfahrens eine klinische Anwendung
möglich machen würde, sondern darüber hinaus reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich des ge-
nerierten Zelltyps und seinen Eigenschaften liefert.

Daher wäre der nächste Schritt in der Forschung, mit Hilfe dieser Ergebnisse im Tiermodell zu
zeigen, dass eine Transplantation der so generierten Zellen zu einer myokardialen Funktions-
verbesserung beiträgt und darüber hinaus diese Zellen für „*Tissue-Engineering*“-Technologien
zu verwenden, um eine langfristige Anwendung am Menschen zu ermöglichen.

4.3 Ausblick

Ziel der aktuellen kardialen Stammzellforschung ist und bleibt langfristig die Anwendung am Menschen zur Verbesserung bzw. Wiederherstellung der kardialen Regeneration. Vor einer Anwendung am Patienten und Implementierung in den klinischen Alltag sind jedoch verschiedene Schwierigkeiten zu meistern, die es in den kommenden Jahren in der Forschung zu lösen gilt.

Eine Grundvoraussetzung ist, dass die Anwendung am Patienten sicher sein muss, d. h. die Transplantation kardialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen darf weder Arrhythmien induzieren, noch zu langfristigen Folgeschäden wie Tumorbildungen führen. Außerdem müssen neben technischen Limitationen- beispielsweise zu geringe Zellmengen- auch potentielle „Nebenwirkungen“ durch die Transplantation- beispielsweise das Problem der Immunsuppression- gelöst werden.

Dass es grundsätzlich möglich ist, kardiale Ersatzzellen funktionell in ein adultes Herz zu transplantieren, konnte mit Hilfe von fetalen kardialen Zellen bereits gezeigt werden.

Die langfristig entscheidende Herausforderung, der sich die gesamte Stammzellforschung stellen muss, ist, dass diese neuen Therapieansätze einen höheren Patientennutzen als die herkömmlichen Therapien bieten müssen. Insbesondere konnten in den letzten Dekaden deutliche Verbesserungen hinsichtlich pharmakologischer und interventioneller Behandlungen für Patienten mit akutem Koronarsyndrom und chronischer Herzinsuffizienz erzielt werden [285, 286]. Diesem direkten Vergleich muss sich die regenerative Medizin stellen.

4.3.1 Herstellung verschiedener spezifischer kardiovaskulärer Subtypen

Es konnte mit Hilfe dieser Arbeit als „*Proof-of-Principle*“ gezeigt werden, dass es möglich ist, mit Hilfe eines Oberflächenmarkers unter der Kontrolle eines kardialen Promotors und anschließender magnetischer Zellsortierung nahezu reine und funktionell unveränderte Kardiomyozytensubpopulationen zu generieren. Es wäre daher von großem Interesse, dieses Prinzip auch auf Promotoren anderer kardialer Transkriptionsfaktoren zu übertragen. Denkbar wäre beispielsweise eine Generierung von Schrittmacherzellen, um gezielt Reizleitungsgewebe herzustellen, um so rhythmogene Defekte- z. B. einen sinuatrialen oder atrioventrikulären Block zu therapieren.

4.3.2 Übertragung auf das humane System

Da Tbx5 ein hochkonservierter Transkriptionsfaktor während der Kardiogenese ist und sich insbesondere in der T-Box aller untersuchter Spezies nahezu unverändert darstellt (s. 1.5.2), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein CD4-Oberflächenprotein unter der Kontrolle eines humanen TBX5-Promotors in murine ES-Zellen transfiziert.

Dennoch bestehen in vielen Aspekten wesentliche Unterschiede zwischen humanen und murinen embryonalen Stammzellen [21], so dass ein direkter Vergleich zwischen beiden Systemen nur mit Vorsicht gezogen werden kann. Da jedoch Protokolle und die Arbeit mit murinen embryonalen Stammzellen besser etabliert sind, ist die vorliegende Arbeit- insbesondere auch aufgrund der ethischen und rechtlichen Schwierigkeiten mit humanen Stammzellen- mit murinen Stammzellen durchgeführt worden. Daher wäre der nächste wesentliche Schritt dieser Arbeit- auch in Hinblick auf eine klinische Anwendung- die Übertragung des verwendeten Konstruktes auf humane ES oder iPS-Zellen.

Es herrscht Einigkeit darüber, dass die Verwendung von humanen Embryonen im Rahmen der Stammzellforschung nur erlaubt sein sollte, wenn Gesundheitsinteresse und die Aussicht auf neue Behandlungsmöglichkeiten für schwere Erkrankungen als Beurteilungskriterien dienen können [282]. Die zugrundeliegende ethische Frage, die hierbei im Raum steht, ist die Frage, ob auch das früheste embryonale Entwicklungsstadium als volles menschliches Leben schützenswert und damit dieses Leben keinerlei Abwägung unterliegen darf, auch wenn vielleicht mit Hilfe dieser gewonnen Stammzellen in Zukunft viele menschliche Leben gerettet werden könnten.

Eine Vermeidung dieser Frage könnte nur durch die Verwendung alternativer Stammzellquellen umgangen werden.

4.3.3 Übertragung des Ansatzes auf andere ethisch unbedenkliche pluripotente Zellen

Die ethische Problematik humaner ES-Zellen und die aktuelle rechtliche Situation in Deutschland und in vielen anderen Ländern führten zu einem starkem wissenschaftlichen Anreiz, alternative pluripotente Zellquellen zu generieren.

Insbesondere die Methode der Reprogrammierung, d.h. das Zurückführen somatischer Zellen in einen frühen embryonalen Zustand, hat in den Forscherkreisen die Hoffnung geweckt, humane Stammzellen durch diese ethisch unbedenklichen Zellen ersetzen zu können. Darüber hinaus könnten diese Zellen durch patientenspezifische Gewinnung das Problem der Immunogenität empfängerfremder Stammzellen lösen.

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass humane induzierte pluripotente Stammzellen sich hinsichtlich des Risikos der Tumorgenität analog zu humanen embryonalen Stammzellen verhalten würden. Neueste Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass induzierte pluripotente Stammzellen ein deutlich höheres Tumorgenitätsrisiko als bisher angenommen inhärent haben [137-139]. So zeigen sich anhand verschiedener Analysen, in welchen beispielsweise die Kopienzahlvariationen (CNV) [137], Punktmutationen [138] und DNA-Methylierungen [139] von iPS-Zellen genauer untersucht wurden, dass iPS-Zellen deutlich häufiger genetische und epigenetische Abnormalitäten aufwiesen als ES-Zellen oder Fibroblasten- die Zellen, aus denen iPS-Zellen in der Regel gewonnen werden. Chromosomale Veränderungen treten dabei- anders als bei ES-Zellen- bereits sehr früh während der Kultivierung auf; insgesamt wird die Häufigkeit von Mutationen um ca. zehnfach höher geschätzt als bei ES-Zellen [138]. So scheint offensichtlich der Prozess der Reprogrammierung und die darauffolgende Vermehrung und Kultivierung der iPS-Zellen im besonderen Maße genetische Alterationen zu begünstigen. Einige Studienergebnisse deuten sogar darauf hin, dass dabei insbesondere Bereiche der DNA-Regionen betroffen sind, welche bei der Kontrolle des Zellzyklus und -wachstums und bei einer potentiellen Krebsentstehung eine entscheidende Rolle spielen [287, 288].

Eine der wesentlichen Voraussetzungen der Zelltherapie ist jedoch eine gewährleistete Sicherheit. Somit gilt es abzuwarten, ob und inwieweit iPS-Zellen ein tumorigenes Risiko bergen und eine adäquate Alternative zu humanen embryonalen Stammzellen langfristig darstellen werden.

4.3.4 Optimale Zellapplikation und „Tissue Engineering“

Eine wesentliche zu klärende Frage bleibt, wie die in der Zellkultur etablierten Herzmuskelzellen am besten in ein Empfängerherz zu applizieren seien, um geschädigtes Myokard optimal zu versorgen.

Eine der möglichen Strategien ist die direkte Injektion von Zellen in das Herz via Thorakotomie; weitere weniger invasive Möglichkeiten der Zellapplikation sind intravenöse, intrakoronare oder transmyokardiale Katheterverfahren [289, 290].

Eine weitere potentielle Strategie wäre, Zellen bereits in der Zellkultur Gewebeverbände ausbilden zu lassen und dieses gezüchtete Gewebe in das geschädigte Herz zu transplantieren, um so einen geringeren Zellverlust zu erleiden. Dieses Verfahren findet beim sogenannten „Tissue Engineering“ Anwendung. Beim myokardialen „Tissue Engineering“ wird versucht, ein dreidimensionales Herzmuskel-ähnliches Konstrukt mit strukturellen und funktionellen Eigenschaften eines nativen Myokards zu schaffen.

Hierbei kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz, die derzeit auf ihre klinische Anwendbarkeit getestet werden. Beim klassischen „*Tissue Engineering*“ werden Zellen auf Matrices ausgesät, welche aus synthetischen oder biologischen Polymeren bestehen. Bei einem anderen Verfahren wird eine Spontanaggregation von unreifen Herzmuskelzellen zu einem Gewebeverbund durch die Verwendung einer Mischung aus Zellen und Kollagen gefördert, um hohe Zelldichten in einen definierten, räumlichen Kontext zu bringen. Eine darauffolgende mechanische Konditionierung fördert die Ausbildung kraftentwickelnder Muskelgewebe.

Eine dritte Strategie verwendet Einzelzelllagen, welche schonend abgelöst werden, um anschließend durch Stapelung dieser Einzelzellschichten *in vitro* und *in vivo* ein mehrschichtiges Herzgewebe zu erzeugen [291] (Bild IV-1).

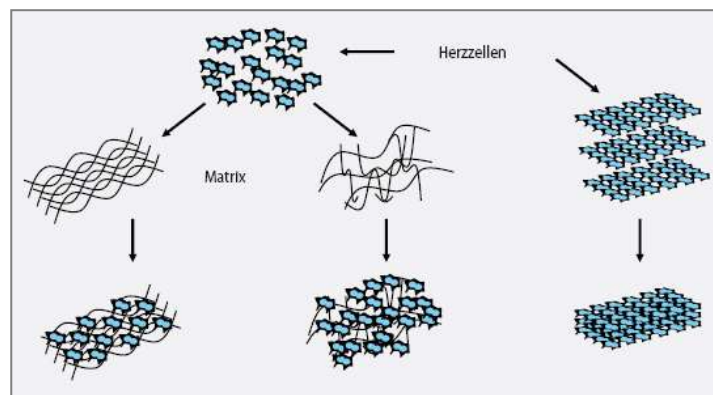


Bild IV-1 Verschiedene Konzepte des „Tissue Engineerings“

Von links nach rechts: 1. Klassisches Verfahren, 2. Spontanaggregation von Zellen in Mischung mit Kollagen, 3. Stapelung von verschiedenen Zellschichten in der Kultur (nach [291]).

Das so künstlich hergestellte Herzgewebe könnte als Implantatmaterial für die Reparatur myokardialer Gewebedefekte verwendet werden und es bestünde außerdem die Möglichkeit, diese hergestellten Gewebe als *in-vitro*-Testsysteme zur Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieformen zu nutzen [291]. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Aufreinigungsverfahren von kardialen Vorläuferzellen würde hierbei durch die Bereitstellung von gut charakterisierten Kardiomyozyten in einer ausreichenden Menge optimale Rahmenbedingungen schaffen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Herzkreislaufkrankungen, welche in Abhängigkeit ihres Schweregrades häufig in eine Herzinsuffizienz münden, stellen heutzutage die mit Abstand häufigste Todesursache weltweit dar. Die momentanen Behandlungsmöglichkeiten einer ausgeprägten, terminalen Herzinsuffizienz beinhalten vor allem medikamentöse Therapien und bieten außer einer Herztransplantation keine längerfristig erfolgreichen Therapieoptionen. Durch den großen Mangel an Spenderorganen wurde in den letzten Jahren intensiv nach Alternativen zur herkömmlichen Herztransplantation gesucht, wobei insbesondere die Stammzellforschung und das „*Tissue Engineering*“ als alternative Ansätze zur Behandlung kardiovaskulärer Leiden in den Vordergrund gerückt sind.

Embryonale Stammzellen stellen aufgrund ihrer pluripotenten Eigenschaften und der Möglichkeit, sich in Kardiomyozyten zu differenzieren, einen großen Hoffnungsträger im Feld der regenerativen Medizin dar. Die erst kürzlich beschriebenen induzierten pluripotenten Stammzellen haben zwar Vorteile in ihren ethischen und immunologischen Eigenschaften und bergen damit ein großes Potential, sind aber zum heutigen Zeitpunkt aufgrund ihrer epigenetischen und genetischen Eigenschaften und der Ineffizienz in ihrem Generierungsprozess bisher keine klare Alternative.

Trotz der großen Fortschritte auf dem Feld der stammzellbasierten Therapien müssen vor einem klinischen Einsatz humaner embryonaler Stammzellen noch zahlreiche Schwierigkeiten gelöst werden: zum einen darf die Patientensicherheit nicht durch teratogenes, arrhythmogenes oder immunogenes Potential der Zellen gefährdet werden; zum anderen müssen auch ethische und rechtliche Fragen langfristig im gesellschaftlichen Konsens geklärt werden.

Die wesentliche Grundvoraussetzung einer erfolgreichen Transplantation kardialer Vorläuferzellen ist jedoch das Vorliegen einer entsprechenden Ausbeute und Reinheit von Herzmuskelzellen, welche mit einer herkömmlichen ES-Zell-Kultur bei einem Kardiomyozytenanteil von 1-10% nicht gewährleistet werden kann. Das von David et al. 2005 entwickelte Verfahren, welches mittels magnetischer Zellsortierung über den stabil transfizierten Oberflächenmarker Δ CD4 embryonale Stammzellen zellschonend aufzureinigen vermag, wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet und speziell auf einen kardialen Promotor übertragen, um kardiale Vorläuferzellen spezifisch aufzureinigen. Mit Hilfe eines dafür entworfenen Vektors wurde über den Promotor des TBX5-Gens der Oberflächenmarker Δ CD4 in stabil transfizierten, murinen ES-Zellen exprimiert. Anschließend wurden diese Zellen mittels magnetischer Zellsortierung hoch aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Spezifität und Vitalität auf molekularer wie auch auf zellulärer Ebene analysiert. Hierbei ließen sich nicht nur die Spezifität des Konstruktes, sondern auch die unveränderten Eigenschaften der kardialen Vorläuferzellen auf mRNA-Ebene, Proteinebene, morphologisch und funktionell nachweisen. Somit stellt das im Rahmen dieser Arbeit vorge-

stellte CMV-TBX5- Δ CD4-Promotorkonstrukt und das verwendete Konzept der magnetischen Zellaufreinigung über ein CD4-Oberflächenprotein einen idealen Ansatz für eine hochspezifische Aufreinigung kardialer Vorläuferzellen zur Zelltransplantation dar. Insbesondere hat das dargestellte Verfahren gegenüber anderen herkömmlichen Aufreinigungsverfahren den Vorteil, dass hier durch ein sehr einfaches und schnelles Verfahren eine besonders hohe Reinheit von kardialen Vorläuferzellen erzielt werden kann und darüber hinaus reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich des generierten Zelltyps und seinen Eigenschaften geliefert werden.

Somit stellt diese Arbeit eine wichtige Grundlage für eine gezielte Zelltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Sie legt die Basis für weitere Forschung in der Stammzelltherapie durch Verwendung dieser Zellen in Rahmen von Tiermodellen und für „*Tissue-Engineering*“-Technologien, um eine langfristige Anwendung am Menschen zu ermöglichen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. *The global burden of disease: 2004 update in Global Burden of Disease (GBD)*. 2008, World Health Organization.
2. DESTATIS, *Herz-/Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache*. Pressemitteilung Nr. 344 der Pressestelle des Statistischen Bundesamtes vom 15. September 2009, 2009.
3. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2002. **106**(24): p. 3068-72.
4. Hunt, S.A., et al., *ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure)*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **38**(7): p. 2101-13.
5. Taylor, D.O., et al., *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Heart Transplant Report-2009*. *J Heart Lung Transplant*, 2009. **28**(10): p. 1007-22.
6. Stehlik, J., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010*. *J Heart Lung Transplant*, 2010. **29**(10): p. 1089-103.
7. *Jährliche Zahlen in Eurotransplant, Statistiken für das Jahr 2009*. Eurotransplant International Foundation.
8. Arie Oosterlee, A.R., ed. *Annual report 2007*. 2007, Eurotransplant International Foundation Leiden.
9. Rajala, K., M. Pekkanen-Mattila, and K. Aalto-Setälä, *Cardiac differentiation of pluripotent stem cells*. *Stem Cells Int*, 2011. **2011**: p. 383709.
10. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, *Regenerating the heart*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(7): p. 845-56.
11. Zhu, W.Z., et al., *Human embryonic stem cells and cardiac repair*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2009. **23**(1): p. 53-68.
12. Soonpaa, M.H., et al., *Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium*. *Science*, 1994. **264**(5155): p. 98-101.
13. Koh, G.Y., et al., *Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(4): p. 2034-42.
14. Leor, J., et al., *Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?* *Circulation*, 1996. **94**(9 Suppl): p. II332-6.
15. Li, R.K., et al., *Cardiomyocyte transplantation improves heart function*. *Ann Thorac Surg*, 1996. **62**(3): p. 654-60; discussion 660-1.
16. Scorsin, M., et al., *Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium?* *Circulation*, 1997. **96**(9 Suppl): p. II-188-93.
17. Etzion, S., et al., *Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(7): p. 1321-30.
18. Reinecke, H., et al., *Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts*. *Circulation*, 1999. **100**(2): p. 193-202.
19. Rippon, H.J. and A.E. Bishop, *Embryonic stem cells*. *Cell Prolif*, 2004. **37**(1): p. 23-34.
20. Brignier, A.C. and A.M. Gewirtz, *Embryonic and adult stem cell therapy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S336-44.
21. Wobus, A.M. and K.R. Boheler, *Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(2): p. 635-78.

22. Greber, B. and H. Scholer, *[A breakthrough in stem cell research? Reprogramming somatic cells into pluripotent stem cells]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2008. **51**(9): p. 1005-13.
23. Taylor, D.A., et al., *Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation*. Nat Med, 1998. **4**(8): p. 929-33.
24. Ghostine, S., et al., *Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction*. Circulation, 2002. **106**(12 Suppl 1): p. I131-6.
25. Reinecke, H., V. Poppa, and C.E. Murry, *Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(2): p. 241-9.
26. Rubart, M., et al., *Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 775-83.
27. Menasche, P., *Skeletal myoblast for cell therapy*. Coron Artery Dis, 2005. **16**(2): p. 105-10.
28. Menasche, P., *Skeletal myoblasts as a therapeutic agent*. Prog Cardiovasc Dis, 2007. **50**(1): p. 7-17.
29. Lee, J. and C.M. Terracciano, *Cell therapy for cardiac repair*. Br Med Bull, 2010. **94**: p. 65-80.
30. Menasche, P., et al., *The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation*. Circulation, 2008. **117**(9): p. 1189-200.
31. Menasche, P., et al., *Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(7): p. 1078-83.
32. Menasche, P., et al., *Myoblast transplantation for heart failure*. Lancet, 2001. **357**(9252): p. 279-80.
33. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
34. Jackson, K.A., et al., *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1395-402.
35. Balsam, L.B., et al., *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 668-73 Epub 2004 Mar 21.
36. Murry, C.E., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 664-8 Epub 2004 Mar 21.
37. Terada, N., et al., *Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 542-5.
38. Alvarez-Dolado, M., et al., *Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 968-73.
39. Nygren, J.M., et al., *Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 494-501.
40. Wollert, K.C., et al., *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. Lancet, 2004. **364**(9429): p. 141-8.
41. Lunde, K., et al., *Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1199-209.
42. Janssens, S., et al., *Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial*. Lancet, 2006. **367**(9505): p. 113-21.
43. Schachinger, V., et al., *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1210-21.
44. Martin-Rendon, E., et al., *Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review*. Eur Heart J, 2008. **29**(15): p. 1807-18.

45. Murtuza, B., et al., *Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4216-21.
46. Xu, X., et al., *Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats*. Coron Artery Dis, 2005. **16**(4): p. 245-55.
47. Kocher, A.A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 430-6.
48. Kinnaird, T., et al., *Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms*. Circulation, 2004. **109**(12): p. 1543-9.
49. Takahashi, M., et al., *Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H886-93.
50. Gneecchi, M., et al., *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement*. FASEB J, 2006. **20**(6): p. 661-9.
51. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
52. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
53. Katsumoto, K., et al., *Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation*. Dev Growth Differ, 2010. **52**(1): p. 115-29.
54. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
55. Smith, A.G., *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 435-62.
56. Rohwedel, J., et al., *Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution*. Cell Biol Int, 1996. **20**(8): p. 579-87.
57. Amit, M., et al., *Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 271-8.
58. Dani, C., et al., *Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 11): p. 1279-85.
59. Fraichard, A., et al., *In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 10): p. 3181-8.
60. Tang, F., et al., *Differentiation of embryonic stem cell to astrocytes visualized by green fluorescent protein*. Cell Mol Neurobiol, 2002. **22**(1): p. 95-101.
61. Kramer, J., et al., *Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4*. Mech Dev, 2000. **92**(2): p. 193-205.
62. Blyszczuk, P., et al., *Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 998-1003.
63. Hori, Y., et al., *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16105-10.
64. Lumelsky, N., et al., *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1389-94.
65. Hamazaki, T., et al., *Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro*. FEBS Lett, 2001. **497**(1): p. 15-9.
66. Jones, E.A., et al., *Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells*. Exp Cell Res, 2002. **272**(1): p. 15-22.
67. Kania, G., et al., *Generation of glycogen- and albumin-producing hepatocyte-like cells from embryonic stem cells*. Biol Chem, 2004. **385**(10): p. 943-53.

68. Rohwedel, J., et al., *Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents*. Dev Biol, 1994. **164**(1): p. 87-101.
69. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **87**: p. 27-45.
70. Maltsev, V.A., et al., *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. Mech Dev, 1993. **44**(1): p. 41-50.
71. Maltsev, V.A., et al., *Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents*. Circ Res, 1994. **75**(2): p. 233-44.
72. Metzger, J.M., W.I. Lin, and L.C. Samuelson, *Vital staining of cardiac myocytes during embryonic stem cell cardiogenesis in vitro*. Circ Res, 1996. **78**(4): p. 547-52.
73. Geijsen, N., et al., *Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 148-54.
74. Hubner, K., et al., *Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1251-6. Epub 2003 May 1.
75. Toyooka, Y., et al., *Embryonic stem cells can form germ cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11457-62.
76. Yu J., J.A.T., *Regenerative Medicine.*, in *Embryonic Stem Cells*. 2006, Department of Health and Human Services.
77. Bremer, S. and T. Hartung, *The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro--the current status of test development*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(22): p. 2733-47.
78. Rolletschek, A., P. Blyszczuk, and A.M. Wobus, *Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects*. Toxicol Lett, 2004. **149**(1-3): p. 361-9.
79. Ben-Hur, T., et al., *Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1246-55.
80. Yang, D., et al., *Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 55-63.
81. Kroon, E., et al., *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 443-52.
82. Segev, H., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters*. Stem Cells., 2004. **22**(3): p. 265-74.
83. Leon-Quinto, T., et al., *In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1442-51.
84. Wang, Q., et al., *Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves*. Stem Cells, 2005. **23**(9): p. 1221-7.
85. Williams, R.L., et al., *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
86. Gough, N.M., et al., *LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells*. Reprod Fertil Dev, 1989. **1**(4): p. 281-8.
87. Pease, S., et al., *Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)*. Dev Biol, 1990. **141**(2): p. 344-52.
88. Pease, S. and R.L. Williams, *Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor*. Exp Cell Res., 1990. **190**(2): p. 209-11.
89. Matsui, Y., K. Zsebo, and B.L. Hogan, *Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture*. Cell, 1992. **70**(5): p. 841-7.
90. Furue, M., et al., *Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2005. **41**(1-2): p. 19-28.

91. Inzunza, J., et al., *Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells*. Stem Cells, 2005. **23**(4): p. 544-9.
92. Yoo, S.J., et al., *Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells*. Exp Mol Med, 2005. **37**(5): p. 399-407.
93. Richards, M., et al., *Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(9): p. 933-6.
94. Amit, M., et al., *Human feeder layers for human embryonic stem cells*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 2150-6.
95. Klimanskaya, I., et al., *Human embryonic stem cells derived without feeder cells*. Lancet, 2005. **365**(9471): p. 1636-41.
96. Ludwig, T.E., et al., *Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions*. Nat Biotechnol., 2006. **24**(2): p. 185-7. Epub 2006 Jan 1.
97. Saric, T., L.P. Frenzel, and J. Hescheler, *Immunological barriers to embryonic stem cell-derived therapies*. Cells Tissues Organs., 2008. **188**(1-2): p. 78-90. Epub 2008 Feb 27.
98. Henderson, J.K., et al., *Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens*. Stem Cells, 2002. **20**(4): p. 329-37.
99. Reubinooff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 399-404.
100. Solter, D. and B.B. Knowles, *Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(11): p. 5565-9.
101. Wobus, A.M., et al., *Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo*. Exp Cell Res, 1984. **152**(1): p. 212-9.
102. Armstrong, L., et al., *mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells*. Mech Dev, 2000. **97**(1-2): p. 109-16.
103. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
104. Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith, *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 372-6.
105. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-40.
106. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
107. Boyer, L.A., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells*. Cell, 2005. **122**(6): p. 947-56.
108. Loh, Y.H., et al., *The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 431-40.
109. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell., 2006. **126**(4): p. 663-76. Epub 2006 Aug 10.
110. Goldthwaite, C.A., *Regenerative Medicine, in The promise of induced pluripotent stem cells (iPSCs)*. 2006, Department of Health and Human Services. .
111. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell., 2007. **131**(5): p. 861-72.
112. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
113. Aoi, T., et al., *Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells*. Science, 2008. **14**: p. 14.
114. Stadtfeld, M., K. Brennand, and K. Hochedlinger, *Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells*. Curr Biol, 2008. **18**(12): p. 890-4.

115. Aasen, T., et al., *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1276-84.
116. Park, I.H., et al., *Disease-specific induced pluripotent stem cells*. Cell, 2008. **134**(5): p. 877-86.
117. Brambrink, T., et al., *Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 151-9.
118. Stadtfeld, M., et al., *Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 230-40.
119. Feng, B., et al., *Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 197-203.
120. Wernig, M., et al., *c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(1): p. 10-2.
121. Huangfu, D., et al., *Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1269-75.
122. Hester, M.E., et al., *Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7044.
123. Kim, J.B., et al., *Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors*. Nature., 2008. **454**(7204): p. 646-50. Epub 2008 Jun 29.
124. Kim, J.B., et al., *Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells*. Cell., 2009. **136**(3): p. 411-9.
125. Kim, J.B., et al., *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 649-3.
126. Feng, B., et al., *Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 301-12.
127. Stadtfeld, M., et al., *Induced pluripotent stem cells generated without viral integration*. Science, 2008. **322**(5903): p. 945-9.
128. Page, R.L., et al., *Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes*. Cloning Stem Cells, 2009. **11**(3): p. 417-26.
129. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. Science., 2008. **322**(5903): p. 949-53. Epub 2008 Oct 9.
130. Okita, K., et al., *Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors*. Nat Protoc, 2010. **5**(3): p. 418-28.
131. Zhou, H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(5): p. 381-4.
132. Kim, D., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 472-6.
133. Anokye-Danso, F., et al., *Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(4): p. 376-88.
134. Miyoshi, N., et al., *Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(6): p. 633-8.
135. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 618-30.
136. Zwi, L., et al., *Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2009. **120**(15): p. 1513-23.
137. Hussein, S.M., et al., *Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 58-62.
138. Gore, A., et al., *Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 63-7.
139. Lister, R., et al., *Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 68-73.
140. Mauritz, C., et al., *Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells*. Circulation., 2008. **118**(5): p. 507-17. Epub 2008 Jul 14.
141. Kuzmenkin, A., et al., *Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells in vitro*. FASEB J, 2009. **23**(12): p. 4168-80.

142. Pfannkuche, K., et al., *Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility*. Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(1-2): p. 73-86.
143. Zhang, J., et al., *Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells*. Circ Res., 2009. **104**(4): p. e30-41. Epub 2009 Feb 12.
144. Moretti, A., et al., *Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome*. N Engl J Med, 2010. **363**(15): p. 1397-409.
145. Kehat, I., et al., *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 407-14.
146. Xu, C., et al., *Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. Circ Res, 2002. **91**(6): p. 501-8.
147. Snir, M., et al., *Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2355-63.
148. Norstrom, A., et al., *Molecular and pharmacological properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(11): p. 1753-62.
149. Lev, S., I. Kehat, and L. Gepstein, *Differentiation pathways in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1047**: p. 50-65.
150. Dai, W., et al., *Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(4): p. 504-16.
151. Cui, L., et al., *Structural differentiation, proliferation, and association of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vitro and in their extracardiac tissues*. J Struct Biol, 2007. **158**(3): p. 307-17.
152. He, J.Q., et al., *Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization*. Circ Res, 2003. **93**(1): p. 32-9.
153. Caspi, O., et al., *In Vitro Electrophysiological Drug Testing using Human Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes*. Stem Cells Dev, 2008.
154. Kehat, I., et al., *High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction*. Circ Res, 2002. **91**(8): p. 659-61.
155. Buckingham, M., S. Meilhac, and S. Zaffran, *Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(11): p. 826-35.
156. Sadler, T.W., *Medizinische Embryologie*. 11 ed. 2003: Georg Thieme Verlag KG.
157. Saga, Y., et al., *MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube*. Development, 1999. **126**(15): p. 3437-47.
158. Saga, Y., S. Kitajima, and S. Miyagawa-Tomita, *Mespl expression is the earliest sign of cardiovascular development*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(8): p. 345-52.
159. Stennard, F.A. and R.P. Harvey, *T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart*. Development, 2005. **132**(22): p. 4897-910.
160. Hoogaars, W.M., et al., *T-box factors determine cardiac design*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(6): p. 646-60.
161. Naiche, L.A., et al., *T-box genes in vertebrate development*. Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 219-39.
162. Korzh, V. and D. Grunwald, *Nadine Dobrovolskaia-Zavadskaia and the dawn of developmental genetics*. Bioessays, 2001. **23**(4): p. 365-71.
163. Plageman, T.F., Jr. and K.E. Yutzey, *T-box genes and heart development: putting the "T" in heart*. Dev Dyn, 2005. **232**(1): p. 11-20.
164. Bruneau, B.G., et al., *A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease*. Cell, 2001. **106**(6): p. 709-21.
165. Garg, V., et al., *GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 443-7.

166. Habets, P.E., et al., *Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation*. Genes Dev, 2002. **16**(10): p. 1234-46.
167. Hiroi, Y., et al., *Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation*. Nat Genet, 2001. **28**(3): p. 276-80.
168. Krause, A., et al., *Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development*. Dev Biol, 2004. **273**(1): p. 106-20.
169. Lamolet, B., et al., *A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins*. Cell, 2001. **104**(6): p. 849-59.
170. Bongers, E.M., et al., *Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(6): p. 1239-48.
171. Basson, C.T., et al., *Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 30-5.
172. Baldini, A., *DiGeorge's syndrome: a gene at last*. Lancet, 2003. **362**(9393): p. 1342-3.
173. Bamshad, M., et al., *Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 311-5.
174. Kirk, E.P., et al., *Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(2): p. 280-91.
175. Koshiba-Takeuchi, K., et al., *Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 95-8.
176. Agulnik, S.I., et al., *Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion*. Genetics, 1996. **144**(1): p. 249-54.
177. Hatcher, C.J. and D.A. McDermott, *Using the TBX5 transcription factor to grow and sculpt the heart*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(13): p. 1414-8.
178. Bruneau, B.G., et al., *Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome*. Dev Biol, 1999. **211**(1): p. 100-8.
179. Li, Q.Y., et al., *Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 21-9.
180. Zaragoza, M.V., et al., *Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal*. Gene, 2004. **330**: p. 9-18.
181. Plageman, T.F., Jr. and K.E. Yutzey, *Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19026-34.
182. Hatcher, C.J., et al., *Identification and localization of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis*. Dev Dyn, 2000. **219**(1): p. 90-5.
183. Boogerd, C.J., et al., *Functional analysis of novel TBX5 T-box mutations associated with Holt-Oram syndrome*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(1): p. 130-9.
184. Koshiba-Takeuchi, K., et al., *Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 175-83.
185. Chapman, D.L., et al., *Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development*. Dev Dyn, 1996. **206**(4): p. 379-90.
186. Takeuchi, J.K., et al., *Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis*. Development, 2003. **130**(24): p. 5953-64.
187. Horb, M.E. and G.H. Thomsen, *Tbx5 is essential for heart development*. Development, 1999. **126**(8): p. 1739-51.
188. Basson, C.T., et al., *Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2919-24.
189. Holt, M. and S. Oram, *Familial heart disease with skeletal malformations*. Br Heart J, 1960. **22**: p. 236-42.
190. Packham, E.A. and J.D. Brook, *T-box genes in human disorders*. Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 1**: p. R37-44.
191. Newbury-Ecob, R.A., et al., *Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study*. J Med Genet, 1996. **33**(4): p. 300-7.
192. Mori, A.D. and B.G. Bruneau, *TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed*. Curr Opin Cardiol, 2004. **19**(3): p. 211-5.

193. Ghosh, T.K., et al., *Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(18): p. 1983-94.
194. Cai, C.L., et al., *T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis*. Development, 2005. **132**(10): p. 2475-87.
195. Barron, M.R., et al., *Serum response factor, an enriched cardiac mesoderm obligatory factor, is a downstream gene target for Tbx genes*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11816-28.
196. Ghosh, T.K., et al., *Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(8): p. 2205-18.
197. Ieda, M., et al., *Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors*. Cell, 2010. **142**(3): p. 375-86.
198. Klug, M.G., et al., *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 216-24.
199. Min, J.Y., et al., *Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats*. J Appl Physiol, 2002. **92**(1): p. 288-96.
200. Min, J.Y., et al., *Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **125**(2): p. 361-9.
201. Behfar, A., et al., *Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart*. Faseb J, 2002. **16**(12): p. 1558-66.
202. Hodgson, D.M., et al., *Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H471-9.
203. Kolossov, E., et al., *Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein*. J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 2045-56.
204. Kolossov, E., et al., *Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2315-27.
205. Caspi, O., et al., *Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(19): p. 1884-93.
206. Kehat, I., et al., *Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(10): p. 1282-9. Epub 2004 Sep 26.
207. Huber, I., et al., *Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation*. FASEB J, 2007. **21**(10): p. 2551-63.
208. Laflamme, M.A., et al., *Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells*. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 663-71.
209. Kofidis, T., et al., *Allopurinol/uricase and ibuprofen enhance engraftment of cardiomyocyte-enriched human embryonic stem cells and improve cardiac function following myocardial injury*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **29**(1): p. 50-5.
210. van Laake, L.W., et al., *Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction*. Stem Cell Res, 2007. **1**(1): p. 9-24.
211. Xue, T., et al., *Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers*. Circulation, 2005. **111**(1): p. 11-20. Epub 2004 Dec 20.
212. Halbach, M., et al., *Electrophysiological maturation and integration of murine fetal cardiomyocytes after transplantation*. Circ Res, 2007. **101**(5): p. 484-92.
213. Rubart, M., et al., *Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation*. Circ Res, 2003. **92**(11): p. 1217-24.
214. Drukker, M., et al., *Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 9864-9.
215. Drukker, M., et al., *Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 221-9.

216. Habib, M., O. Caspi, and L. Gepstein, *Human embryonic stem cells for cardiomyogenesis*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(4): p. 462-74.
217. Nussbaum, J., et al., *Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response*. FASEB J, 2007. **21**(7): p. 1345-57.
218. Taylor, C.J., et al., *Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching*. Lancet, 2005. **366**(9502): p. 2019-25.
219. Drukker, M., *Recent advancements towards the derivation of immune-compatible patient-specific human embryonic stem cell lines*. Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 123-9.
220. Chidgey, A.P., et al., *Tolerance strategies for stem-cell-based therapies*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 330-7.
221. Byrne, J.A., et al., *Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 497-502.
222. French, A.J., et al., *Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts*. Stem Cells, 2008. **26**(2): p. 485-93.
223. Brambrink, T., et al., *ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(4): p. 933-8.
224. Ying, Q.L., et al., *Changing potency by spontaneous fusion*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 545-8.
225. Matsumura, H., et al., *Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells*. Nat Methods, 2007. **4**(1): p. 23-5.
226. Guan, K., et al., *Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis*. Nature., 2006. **440**(7088): p. 1199-203. Epub 2006 Mar 24.
227. Kossack, N., et al., *Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells*. Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 138-49.
228. Mai, Q., et al., *Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts*. Cell Res., 2007. **17**(12): p. 1008-19.
229. Xing, F., et al., *Parthenogenetic embryonic stem cells derived from cryopreserved newborn mouse ovaries: a new approach to autologous stem cell therapy*. Fertil Steril, 2009. **91**(4): p. 1238-44.
230. De Sousa, P.A. and I. Wilmut, *Human parthenogenetic embryo stem cells: appreciating what you have when you have it*. Cell Stem Cell., 2007. **1**(3): p. 243-4.
231. Shao, H., et al., *Generation and characterization of mouse parthenogenetic embryonic stem cells containing genomes from non-growing and fully grown oocytes*. Cell Biol Int., 2007. **31**(11): p. 1336-44. Epub 2007 May 21.
232. Gurdon, J.B., *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*. J Embryol Exp Morphol, 1962. **10**: p. 622-40.
233. Muller-Ehmsen, J., et al., *Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(2): p. 107-16.
234. Zhang, M., et al., *Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 907-21.
235. Laflamme, M.A., et al., *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(9): p. 1015-24.
236. Lensch, M.W. and T.A. Ince, *The terminology of teratocarcinomas and teratomas*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1211; author reply 1211-2.
237. Lawrenz, B., et al., *Highly sensitive biosafety model for stem-cell-derived grafts*. Cytotherapy, 2004. **6**(3): p. 212-22.
238. Gepstein, L., *Derivation and potential applications of human embryonic stem cells*. Circ Res, 2002. **91**(10): p. 866-76.
239. Filipczyk, A.A., et al., *Regulation of cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by extracellular signalling*. Cell Mol Life Sci., 2007. **64**(6): p. 704-18.
240. Jing, D., et al., *Stem cells for heart cell therapies*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(4): p. 393-406.

241. Olmer, R., et al., *Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors*. Tissue Eng Part C Methods, 2012. **18**(10): p. 772-84.
242. Zweigerdt, R., *Large scale production of stem cells and their derivatives*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 201-35.
243. Kawai, T., et al., *Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2*. Circ J, 2004. **68**(7): p. 691-702.
244. Kanno, S., et al., *Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12277-81 Epub 2004 Aug 10.
245. Wobus, A.M., et al., *Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(6): p. 1525-39.
246. Takahashi, T., et al., *Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes*. Circulation., 2003. **107**(14): p. 1912-6. Epub 2003 Mar 31.
247. Yoon, B.S., et al., *Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment*. Differentiation, 2006. **74**(4): p. 149-59.
248. David, R., et al., *Forward programming of pluripotent stem cells towards distinct cardiovascular cell types*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 263-72.
249. Conley, B.J., et al., *Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 555-67.
250. Muller, M., et al., *Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2540-8.
251. Anderson, D., et al., *Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells*. Mol Ther, 2007. **15**(11): p. 2027-36.
252. Groebner, M., R. David, and W.M. Franz, [Embryonic stem cells. Future perspectives]. Internist (Berl), 2006. **47**(5): p. 502, 504-8.
253. Zandstra, P.W., et al., *Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Tissue Eng, 2003. **9**(4): p. 767-78.
254. David, R., M. Groebner, and W.M. Franz, *Magnetic cell sorting purification of differentiated embryonic stem cells stably expressing truncated human CD4 as surface marker*. Stem Cells, 2005. **23**(4): p. 477-82.
255. Huang, W.Y., et al., *Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 482-3.
256. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
257. *MACSelect System- the smart selection after each transfection*. 2011; Available from: <http://www.miltenyibiotec.com>.
258. Terese Winslow, R.P.B.T.N.I.O.H., *Stem Cells: Scientific Progress and future Research Directions*. 2001.
259. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
260. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. Biotechnology, 1992. **24**: p. 145-9.
261. Sasaki, D.T., S.E. Dumas, and E.G. Engleman, *Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence*. Cytometry, 1987. **8**(4): p. 413-20.
262. Faulstich, H., et al., *Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin*. J Muscle Res Cell Motil, 1988. **9**(5): p. 370-83.
263. Miki, M., et al., *Interaction of phalloidin with chemically modified actin*. Eur J Biochem, 1987. **165**(1): p. 125-30.
264. Christoffels, V.M., et al., *T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers*. Dev Dyn, 2004. **229**(4): p. 763-70.
265. Yamagishi, H., et al., *The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation*. Dev Biol., 2001. **239**(2): p. 190-203.

266. Dixon, J.D., M.J. Forstner, and D.M. Garcia, *The alpha-actinin gene family: a revised classification*. J Mol Evol, 2003. **56**(1): p. 1-10.
267. Willecke, K., et al., *Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome*. Biol Chem, 2002. **383**(5): p. 725-37.
268. Harrelson, Z., et al., *Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development*. Development, 2004. **131**(20): p. 5041-52.
269. Xia, Y., et al., *Regulation of gap-junction protein connexin 43 by beta-adrenergic receptor stimulation in rat cardiomyocytes*. Acta Pharmacol Sin, 2009. **30**(7): p. 928-34.
270. Riaz, A.M., S.Y. Kwon, and W.L. Stanford, *Stem cell sources for regenerative medicine*. Methods Mol Biol, 2009. **482**: p. 55-90.
271. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
272. Galli, D., et al., *Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: a comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(4): p. 692-7.
273. Hutcheson, K.A., et al., *Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts*. Cell Transplant, 2000. **9**(3): p. 359-68.
274. Laflamme, M.A., et al., *Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms*. Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 307-39.
275. Lebkowski, J., *GRNOPC1: the world's first embryonic stem cell-derived therapy*. Interview with Jane Lebkowski. Regen Med, 2011. **6**(6 Suppl): p. 11-3.
276. Lok, C., *Stem-cell research: Never say die*. Nature, 2012. **481**(7380): p. 130-3.
277. Singla, D.K., et al., *Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40**(1): p. 195-200.
278. Singla, D.K., G.E. Lyons, and T.J. Kamp, *Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(2): p. H1308-14.
279. Swijnenburg, R.J., A.Y. Sheikh, and R.C. Robbins, *Comment on "Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response"*. FASEB J, 2007. **21**(7): p. 1290; author reply 1291.
280. Menasche, P., *Stem cell therapy for heart failure: are arrhythmias a real safety concern?* Circulation, 2009. **119**(20): p. 2735-40.
281. Forschung, B.f.B.u. *Das Stammzellgesetz*. 01.06.2011 18.08.11]; <http://www.bmbf.de/de/2657.php%5D>.
282. Hescheler, J. and C. Hauskeller, *[From basic research to the clinic. Obstacles and options for stem cell therapies]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2008. **51**(9): p. 1014-20.
283. Iida, M., et al., *Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation*. Faseb J., 2005. **19**(3): p. 371-8.
284. Pfister, O., et al., *CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation*. Circ Res, 2005. **97**(1): p. 52-61.
285. Levy, D., et al., *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(18): p. 1397-402.
286. Fox, K.A., et al., *Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999-2006*. JAMA, 2007. **297**(17): p. 1892-900.
287. Mayshar, Y., et al., *Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 521-31.
288. Laurent, L.C., et al., *Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(1): p. 106-18.
289. Dimmeler, S., A.M. Zeiher, and M.D. Schneider, *Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 572-83.

-
290. Gersh, B.J., et al., *Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective*. Mayo Clin Proc, 2009. **84**(10): p. 876-92.
291. Zimmermann, W.H., [*Heart tissue from embryonic stem cells*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2008. **51**(9): p. 1021-5.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
ANP	Atriales natriuretisches Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ASD	Atriumseptumdefekt
Bp	Basenpaar
BNP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CD4 ⁺	CD4 positiv, CD4 exprimierend
cDNA	Complementary DNA
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CK-MB	Creatin-Kinase (Myokardtyp)
CMV	Cytomegalie Virus
c-Myc	Myelocytomatosis Cellular Oncogene
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Cycle Threshold
Cx40	Connexin 40
Cy3	Cyanin 3
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ΔCD4	Intrazellulär deletiertes CD4
E	Embryonalentwicklungstag
EB	Embryoid Body
E.coli	Escherichia coli
EcoRI	Restriktionsendonuklease (Nuklease I aus dem Stamm R von E. coli)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
Esrrb	Estrogen-related Receptor Beta
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration (behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneizulassungsbehörde der USA)
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G418	Geneticinsulphat (Neomycin)
Gata4	GATA bindendes Protein 4
GSES	Murine ES-Zellen der Linie GSES
h	Stunde
hES-Zellen	Humane embryonale Stammzellen
hESC	Humane embryonale Stammzellen

H ₂ O	Wasser
H4	Histon 4
HindIII	Restriktionsendonuklease aus dem Bakterium Haemophilus Influenzae
HLA	Human Leukocyte Antigen
HOS	Holt-Oram-Syndrom
ICM	Innere Zellmasse (Inner Cell Mass)
iPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
IgG	Immunoglobulin G
Isl1	Islet 1
kb	Kilobasenpaare
kDa	kiloDalton
Klf4	Krueppel-like Factor 4
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
M	Mol pro Liter
MACS	Magnetic Cell Sorting
MEA	Microelectrode array
Mef2c	Myocyte Enhancer Factor 2c
MEFs	Embryonale Mausfibroblasten
MesP1	Mesoderm Posterior 1
mES-Zellen	Murine embryonale Stammzellen
MHC	Myosin Heavy Chain
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Myosin Light Chain
MLC-2v	Myosin Light Chain 2v
mMol	Millimol
mRNA	Messenger RNA
Myh6	Myosin Heavy Chain 6
ng	Nanogramm
Nkx2.5	Nk2 Transcription Factor Related 5
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
Nppa	Natriuretic Precursor Peptide A
Oct3/4	Octamer binding transcription factor 3/4
ORF	Offenes Leseraster (Open Reading Frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
pH	Potentia Hydrogenii (Wasserstoffkraft)
PI	Propidiumjodid
piPSCs	Protein-iduzierte pluripotente Stammzellen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SCNT	Somatic Nuclear Transfer Technology
SDS	Natriumdodecylsulfat

Sox2	Sex Determining Region Y-Box 2
Srf	Serum Response Factor
SSEA1	Stage-Specific Embryonic Antigen 1
SSEA3	Stage-Specific Embryonic Antigen 3
SSEA4	Stage-Specific Embryonic Antigen 4
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBE	T-Box bindendes Element
Tbx1	T-Box-Protein 1
Tbx2	T-Box-Protein 2
Tbx5	T-Box-Protein 5
Tbx18	T-Box-Protein 18
Tbx20	T-Box-Protein 20
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFβ1	Transforming Growth Factor β1
T _m	Schmelztemperatur
U	Units (Einheiten)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSD	Ventrikelseptumdefekt

DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin- Förderung von Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz in der I. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang-Michael Franz für die Vergabe des Themas und die vorzügliche Förderung meiner Arbeit.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Robert David für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit. Er hat mich im gesamten Prozess dieser Arbeit immer unterstützt und motiviert und stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen und ermutigenden Diskussionen zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die hervorragende Organisation des Promotionsstudiengangs.

Auch bedanke ich mich bei den technischen Assistentinnen Christiane Groß, Judith Arcifa und Barbara Markieton, ohne deren Einarbeitung und Unterstützung die Laborarbeit in diesem Umfang nicht hätte entstehen können.

Mein weiterer Dank gilt meinen Co-Doktoranden Herrn Florian Schwarz, Herrn Marcus-André Deutsch und Frau Evelyn Fischer für die zahlreichen gemeinsam verbrachten Laborstunden und wissenschaftlichen und freundschaftlichen Unterhaltungen, die ich immer in bester Erinnerung behalten werde.

Ich danke auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Franz für die stets gute und freundliche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit und meines Studiums über jedes erdenkliche Maß unterstützt und motiviert haben und auch in schwierigen Zeiten immer für mich da waren.